

Effekte einer antenatalen Glukokortikoidgabe auf eine perinatale Hirnschädigung

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Anett Herrmann
geboren am 24.02.1979 in Jena

Gutachter

- 1. Prof. Schröder (Hamburg)**
- 2. Prof. Schleußner (Jena)**
- 3. PD Dr. Schwab**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 3.07.2007

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	5
2	EINLEITUNG	7
2.1	Klinische Bedeutung einer antenatalen Glukokortikoidtherapie	7
2.2	Für die zerebrale Maturation wesentliche Proteine	9
2.2.1	Neuronale Zytoskelettproteine MAP1B und MAP2	9
2.2.2	Neuronales Strukturprotein Synaptophysin	10
2.2.3	Glukosetransportproteine GLUT1 und GLUT3	10
2.3	Effekte einer antenatalen Glukokortikoidgabe auf das normoxische Gehirn	11
2.3.1	Mechanismen der Glukokortikoidwirkung	11
2.3.2	Neurotoxische Glukokortikoideffekte	13
2.3.3	Glukokortikoideffekte auf den Hirnmetabolismus	14
2.3.4	Glukokortikoideffekte auf die Hirndurchblutung	14
2.4	Effekte einer antenatalen Glukokortikoidgabe auf das hypoxische Gehirn	15
2.4.1	Pathophysiologie perinataler Hirnschäden	15
2.4.2	Effekte einer Ischämie auf MAP1B und MAP2	18
2.4.3	Effekte einer Ischämie auf Synaptophysin	18
2.4.4	Effekte einer Ischämie auf GLUT1 und GLUT3	18
2.4.5	Glukokortikoideffekte auf eine durch perinatale Asphyxie hervorgerufene Hirnschädigung	19
2.5	Zielstellung	21
3	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	Experiment	23

3.1.1	Experimentelles Protokoll	23
3.1.2	Chirurgische Instrumentierung der Feten	24
3.1.3	Durchführung der fetalen Asphyxie	25
3.2	Histochemische und immunhistochemische Untersuchungen	27
3.2.1	Perfusion und Vorbereitung der Gehirne	27
3.2.2	Histologischer und immunhistochemischer Nachweis der Hirnschädigung	28
3.2.3	Lichtmikroskopische und quantitative Auswertung	30
3.2.4	Statistische Auswertung	32
4	ERGEBNISSE	33
4.1	Physiologische Parameter	33
4.2	Zerebrale Schädigungsmuster nach einer intrauterinen Asphyxie und die Effekte von Betamethason	37
4.2.1	Neokortex	37
4.2.2	Hippokampus	41
4.2.3	Striatum	43
4.3	Morphologische Effekte einer intrauterinen Asphyxie auf ausgewählte Proteine und die Effekte von Betamethason	44
4.3.1	Neuronale Zytoskelettproteine MAP1B und MAP2	44
4.3.2	Neuronales Strukturprotein Synaptophysin	48
4.3.3	Glukosetransportproteine GLUT1 und GLUT3	51
5	DISKUSSION	55
5.1	Methodendiskussion	55
5.1.1	Tiermodell	55
5.1.2	Verwendete Glukokortikoide und Applikationsform	56
5.1.3	Asphyxiemodell	57
5.1.3.1	Abhängigkeit der Hirnschädigung vom Gestationsalter	57

5.1.3.2	Standardisierung der Hirnschädigung	58
5.1.3.3	Methodisch bedingte zerebrale Schädigungen	58
5.1.4	Nachweis zerebraler Strukturproteine und ihrer Schädigung	59
5.1.5	Relevanz des Asphyxiemodells	60
5.2	Diskussion der Ergebnisse	63
5.2.1	Zerebrale Hirnschädigung nach einer fetalen Asphyxie und Reperfusion	63
5.2.2	Pathophysiologie der hypoxischen zerebralen Schädigung	64
5.2.3	Muster der zerebralen Hirnschädigung	65
5.2.3.1	Vulnerable Hirnregionen	65
5.2.3.2	Effekte der Asphyxie auf das neuronale Zytoskelett	66
5.2.3.3	Effekte der Asphyxie auf Synaptophysin	67
5.2.3.4	Effekte der Asphyxie auf die Glukosetransportproteine	67
5.2.4	Effekte von Betamethason auf eine perinatale Asphyxie	71
5.2.4.1	Betamethasoneffekt auf die zerebrale Hirnschädigung	71
5.2.4.2	Betamethasoneffekt auf GLUT1 und GLUT3	74
5.2.4.3	Betamethasoneffekt auf MAP1B und MAP2	76
5.2.4.4	Betamethasoneffekt auf Synaptophysin	76
6	SCHLUSSFOLGERUNGEN	78
7	LITERATURVERZEICHNIS	80
8	ANHANG	100
8.1	Danksagung	100
8.2	Lebenslauf	101
8.3	Ehrenwörtliche Erklärung	102

Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BM	Betamethason
BHS	Bluthirnschranke
DAB	Diaminobenzidin
dGA	Tage Gestationsalter
GW	Gestationswoche
GLUT1	Glukosetransportprotein 1
GLUT3	Glukosetransportprotein 3
GMH	Germinale Matrixhämorrhagie
HE	Hämatoxylin-Eosin
HHN-Achse	Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren-Achse
IR	Immunreaktivität
IVH	Intraventrikuläre Hämorrhagie
kDa	KiloDalton
MAP1B	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1B
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
Na ⁺ -K ⁺	Natrium-Kalium
OT	Objektträger
O ₂ %	Sauerstoffsättigung
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
RDS	Respiratory Distress Syndrom, Atemnotsyndrom
sham	scheinoperiert
SSV	Small Synaptic Vesicle, kleine synaptische Vesikel
SSW	Schwangerschaftswoche
UCO	Umbilical Cord Occlusion, Nabelschnurokklusion
ZNS	Zentralnervensystem

1 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Glukokortikoiden in der klinisch genutzten Dosis zur Förderung der fetalen Lungenreifung bei der Gefahr einer Frühgeburt auf die Gehirnschädigung nach einer perinatalen Asphyxie anhand ausgewählter Strukturproteine am kliniknahen Tiermodell „chronisch instrumentiertes fetales Schaf“ zu analysieren. Gerade Kinder, die vom Risiko einer Frühgeburt bedroht sind und vornehmlich Glukokortikoide zur Förderung der Lungenreifung erhalten, haben ein höheres Risiko eine perinatale Hypoxie zu erleiden.

Zu den Glukokortikoideffekten in pharmakologischen Dosen auf eine hypoxisch-ischämische Hirnschädigung liegen widersprüchliche Ergebnisse vor, die hauptsächlich am Modell der neonatalen Ratte gewonnen wurden. Einerseits reduzieren Glukokortikoide einen hypoxisch-ischämischen Hirnschaden an neonatalen Ratten. Dieser Effekt steht im Widerspruch zu den potentiell neurotoxischen und hirndurchblutungssenkenden Effekten, die durch unsere Arbeitsgruppe am normoxischen fetalen Primaten- und Schafhirn nachgewiesen werden konnten und die im adulten Rattengehirn einen hypoxisch-ischämischen Hirnschaden verstärken.

Im Alter von 126 ± 1 dGA (0,84 der Gestationsdauer bei einer Gestationsdauer von 150 Tagen) wurde eine 4 x 4 -minütige komplette repetitive Okklusion der Nabelschnur im Abstand von 30 Minuten, als Modell einer häufigen Ursache für eine fetale Asphyxie, induziert. Das Trächtigkeitsalter entspricht der 32.- 34. SSW bei menschlichen Feten und damit einem Gestationsalter, in dem klinisch häufig Glukokortikoide angewendet werden.

Die Quantifizierung des hypoxisch-ischämischen Hirnschadens erfolgte 24 h nach der Asphyxie mittels Übersichtsfärbung durch HE und der immunhistochemischen Darstellung der Strukturproteine MAP und Synaptophysin. Das wie auch im menschlichen Feten typische Muster einer zerebralen Hirnschädigung mit neuronalen Nekrosen im parasagittalen Kortex und im Hippokampus ließ sich durch eine intrauterine Asphyxie am fetalen Schaf reproduzieren. Begleitet war diese Schädigung von einem Verlust der

neuronalen Zytoskelettproteine MAP1B und MAP2 sowie des Strukturproteins Synaptophysin. Zudem zeigte sich eine Hochregulation der Glukosetransportproteine GLUT1 und GLUT3 nach Asphyxie, die für den Glukosetransport über die Bluthirnschranke und über die Membranen der Neuronen verantwortlich sind. Offensichtlich reicht der Anstieg von GLUT1 und GLUT3 in den vulnerablen Gehirnregionen zur Neuroprotektion nicht aus, wie in vorliegender Arbeit für den parasagittalen Kortex und hippocampale Strukturen gezeigt wurde.

Betamethason induzierte eine Verstärkung des neuronalen Zellschadens in den gegenüber einer Asphyxie vulnerablen Regionen des parasagittalen Kortex und des Hippokampus. Im Gegensatz zu unserer Hypothese, dass die Glukoseaufnahme in die Zelle durch eine glukokortikoidbedingte Hemmung der Glukosetransporter vermindert ist, bewirkt Betamethason keine verminderte Expression von GLUT1 und GLUT3, überdies sogar eine gesteigerte Expression von GLUT1. In den nekrosefreien Regionen scheint sich der Anstieg von GLUT1 durch die Gabe von Betamethason positiv auszuwirken, wie an dem verminderten Verlust der Zytoskelettproteine MAP1B und MAP2 unter der Gabe von Betamethason deutlich wird.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die klinisch genutzte Glukokortikoiddosis zu einer erhöhten Vulnerabilität des fetalen Gehirns gegenüber metabolischen Insulten wie einer perinatalen Asphyxie führt, aber auch einen neuroprotektiven Effekt in Regionen hat, die von der Schädigung nicht primär betroffen sind. Die Untersuchungen sollen dazu beitragen, die Entscheidung in der Praxis zu einer antenatalen Glukokortikoidgabe unter Berücksichtigung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses streng abzuwägen.

2 Einleitung

2.1 Klinische Bedeutung einer antenatalen Glukokortikoidtherapie

Glukokortikoide werden routinemäßig bei Schwangeren mit drohender Frühgeburt zur Induktion der fetalen Lungenreifung eingesetzt.

Mount Liggins entdeckte 1969 am fetalen Schaf, welches als tierexperimentelles Modell für die menschliche Fetalperiode gilt (Astrom, 1967; Dobbing & Sands, 1979), dass eine pränatale Glukokortikoidbehandlung die Lungenreifung beschleunigt (Liggins, 1969) und sich somit die perinatale Sterblichkeit und die Inzidenz des Atemnotsyndroms (Respiratory Distress Syndrom, RDS) deutlich reduzieren lassen (Liggins & Howie, 1972). Darüber hinaus wirken Glukokortikoide protektiv gegenüber intraventrikulären Blutungen (Leviton et al., 1993; Elimian et al., 1999). Diese Untersuchungen fanden Anerkennung in den 1995 veröffentlichten Richtlinien der National Institutes of Health (NIH). Antenatale Glukokortikoide reduzieren signifikant das Risiko von Mortalität, Atemnotsyndrom (RDS) und intraventrikulärer Hämorrhagie bei Frühgeborenen zwischen der 24. und der 34. Schwangerschaftswoche (SSW), bei denen innerhalb von 7 Tagen das Risiko einer Frühgeburt besteht (NIH Consensus Statement 2000).

Aufgrund der kontinuierlich zunehmenden Frühgeborenenrate, z.B. betrug sie in den USA 12,3 % (Martin et al., 2005), und den herausgegebenen Therapieempfehlungen ist zwischen 1985 und 2000 in den USA die Zahl der antepartalen Glukokortikoidbehandlungen bei den von einer Frühgeburt bedrohten Müttern von 8 % auf 75 % gestiegen (Meadow et al., 2003). Die Tendenz ist weiter steigend.

Jedoch wurden in den letzten Jahren zunehmend experimentell erhobene Hinweise auf eine Reihe unerwünschter Nebenwirkungen auf das Herz-Kreislauf- und das Zentralnervensystem nachgewiesen.

Eine Metaanalyse klinischer Studien zu den neurologischen Nebenwirkungen einer unmittelbar postnatalen Glukokortikoidtherapie bei Frühgeborenen zur

Prävention des RDS zeigte einen deutlichen Anstieg der Inzidenz einer spastischen Geburtslähmung und anderer entwicklungsneurologischer Störungen (Barrington, 2001). Bei einer pränatalen Glukokortikoidgabe gibt es Hinweise für kognitive Störungen und Verhaltensauffälligkeiten (Sloboda et al., 2005; Owen et al., 2005).

Glukokortikoide verursachen aufgrund einer peripheren Vasokonstriktion eine unmittelbare Steigerung des arteriellen Blutdruckes beim Feten (Derks et al., 1997). Diese Blutdrucksteigerung konnte bislang sowohl bei unreifen (Tangalakis et al., 1992) und reifen Schaffeten (Derks et al., 1997; Schwab et al., 2000; Roedel, 2002) als auch bei frühgeborenen Babies (Demarini et al., 1999; Kari et al., 1994) nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde nach einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung bei adulten Ratten (Levitt et al., 1996; Celsi et al., 1998) sowie beim adulten Schaf (Dodic et al., 1998) auch im späteren Leben eine arterielle Hypertonie beobachtet. D.h. neben den akuten Effekten wie z.B. auf das Herz-Kreislauf-System werden auch „programmierende“ Effekte (fetal programming) deutlich. Mit Hilfe der fetalen Magnetenzephalographie konnte eine akute Verzögerung kortikaler Latenzen akustisch evozierter Potentiale 24h nach Betamethasongabe zur Förderung der fetalen Lungenreifung nachgewiesen werden (Schleussner et al., 2004).

Akute Effekte einer maternalen Glukokortikoidapplikation zeigten sich bei menschlichen Feten in Form von abnehmender Körperbewegung, Atemaktivität und Herzfrequenzvariabilität als möglicher Ausdruck eines Effektes auf die Hirnstammaktivität (Derks et al., 1995; 1991; Mulder et al., 1994; Senat et al., 1998). Unsere Arbeitsgruppe konnte einen Verlust von für die Hirnentwicklung und -funktion wichtigen Strukturproteinen, wie den Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAP) und Synaptophysin sowohl bei reifen Schaffeten (Schwab et al., 2001) als auch bei unreifen Primatenfeten (Antonow-Schlorke et al., 2003) nach einer pränatal applizierten Glukokortikoidgabe beobachten. Ein ähnlicher Effekt für den Menschen ist wahrscheinlich.

Aus diesen Gründen besteht ein wachsendes Interesse an experimentellen und klinischen Daten zur konsequenten Indikationsstellung einer antenatalen Glukokortikoidtherapie.

2.2 Für die zerebrale Maturation wesentliche Proteine

2.2.1 Neuronale Zytoskelettproteine MAP1B und MAP2

MAPs sind strukturelle Proteine zum Aufbau und Erhalt der Neuroarchitektur (Johnson & Jope, 1992). Sie erfüllen als Zytoskelettproteine wichtige Funktionen für die Regulation der neuronalen Morphogenese (Tucker, 1990; Johnson & Jope, 1992) sowie für die neuronale Integrität, indem sie die Fortsätze der Nervenzellen stabilisieren und den intrazellulären Transport sicherstellen (Bershadsky & Vasiliev, 1989). Sie bestimmen die Anordnung des Tubulins, binden und stabilisieren die Mikrotubuli und stellen Brückenverbindungen zwischen den Mikrotubuli her (Hirokawa, 1994; Tögel et al., 1998). Ihre Expression ist stark mit bestimmten Phasen der Ontogenese assoziiert (Tucker, 1990). MAP1B und MAP2 werden ab der 9. SSW im menschlichen fetalen Gehirn gefunden (Arnold & Trojanowski, 1996; Viereck et al., 1988). Beide Proteine werden wachstumsreguliert exprimiert. Dabei wird MAP1B vorzugsweise in sehr frühen Stadien der Embryonalentwicklung exprimiert, bei der Ratte mit Beginn der neuronalen Differenzierung. Es ist spezifisch in der Fetalperiode für die Aussprossung der neuronalen Fortsätze von Bedeutung (Gordon-Weeks, 1991). Während der Ontogenese wird MAP1B hauptsächlich in den Axonen, aber auch in allen anderen neuronalen Zellkompartimenten gefunden (Tucker, 1990).

MAP2 spielt mit seinen juvenilen Isoformen, die in allen Neuriten vorkommen (Cambray-Deakin & Burgoyne, 1991), ebenfalls eine Rolle für das Neuritenwachstum (Ferreira et al., 1989, Tanner et al., 2000). In reifen Neuronen wird MAP2 in Zellkörpern und in den Dendriten gefunden (Leclerc et al., 1996).

Die zeitliche Korrelation der Zytoskelettveränderungen zur Synaptogenese führte zu der Vermutung, dass die juvenilen Formen MAP1B und MAP2 eine Bedeutung für die Plastizität und Flexibilität der neuronalen Fortsätze während der neuronalen Aussprossung haben (Ferreira et al., 1989; Johnson & Jope, 1992; Tucker et al., 1988).

2.2.2 Neuronales Strukturprotein Synaptophysin

Synaptophysin ist ein integrales, kalziumbindendes Membranglykoprotein der kleinen synaptischen Vesikel mit einem Molekulargewicht von 38kDa, das in mindestens 95% aller neokortikalen Synapsen immanent ist (Rehm et al., 1986). Wegen seiner spezifischen Lokalisation in den Membranen synaptischer Vesikel stellt es einen optimalen Marker für Synapsen unabhängig vom Transmitter und für Nervenendigungen im Allgemeinen dar (Wiedenmann & Franke, 1985; Navone et al., 1986). Synaptophysin besitzt vier transmembrane Domänen, wobei sowohl der C- als auch der N-Terminus zur Zytoplasmaseite zeigen. Bei Anwesenheit hoher Ca^{2+} -Konzentrationen formt es einen Komplex mit Dynamin, das an der Endozytose synaptischer Vesikel beteiligt ist. Ca^{2+} -Ionen binden an den zytoplasmatischen Terminus und ermöglichen somit die Transduktion des Ca^{2+} Signals zur Exozytose der kleinen synaptischen Vesikel (Rehm et al., 1986). Synaptophysin eignet sich aufgrund der frühen Expression als nützlicher Marker der Synaptogenese (Knaus et al., 1986; Ovtscharoff et al., 1993) und der synaptischen Dichte unter physiologischen und pathologischen Bedingungen (Sarnat et al., 1999). Synaptophysin konnte in unserer Arbeitsgruppe im fetalen Schaf bereits zum Zeitpunkt 0,73 der Gestationsdauer nachgewiesen werden (Colberg et al., 2004).

2.2.3 Glukosetransportproteine GLUT1 und GLUT3

Wie beim Erwachsenen ist auch für Feten und Neugeborene Glukose die bevorzugte Energiequelle (Scheinberg, 1965; Vannucci & Simpson, 2003), welche für die normalen zerebralen Oxidationsmechanismen benötigt wird (Vannucci & Vannucci, 2000). Studien an Tieren und Menschen zeigen, dass die zerebrale Glukoseutilisation initial niedrig ist und mit zunehmendem Alter steigt. Der Glukosetransport in das Gehirn wird durch erleichterte Diffusion (Takata 1996, Übersichten in Löffler & Petrides, 1997) mittels spezifischer Glukosetransportproteine (GLUT) über die Bluthirnschranke (GLUT1) und über die Membranen der Neuronen (GLUT3) vermittelt. Die Expression beider Transportproteine wird bedarfsabhängig durch die regional unterschiedliche Glukoseutilisation geregelt (Vannucci & Vannucci, 2000).

Im Gehirn kommt GLUT1 in zwei isoformen Massen vor, einmal als 55 kDa großes Molekül, welches in hoher Konzentration in Endothelzellen zerebraler Mikrogefäße, vor allem der Blut-Hirn-Schranke (BHS), nicht aber in Neuronen oder Gliazellen vorhanden ist und zweitens als 45 kDa großes Molekül, angesiedelt im Plexus choroideus, im Ependym und in Gliazellen (Dick et al. 1984, Gerhart et al. 1989, Maher et al. 1993, Vannucci & Simpson, 2003). Der zerebrale Glukosetransport durch die BHS korreliert signifikant mit der Glukosekonzentration im Blutplasma, wie bereits im Gehirn frühgeborener Kinder in einem Gestationsalter von der 27. bis 36. SSW nachgewiesen werden konnte (Powers et al., 1998). Dabei haben die kinetischen Konstanten des Glukosetransports im fetalen und reifen Gehirn vergleichbare Werte, welche dafür sprechen, dass die Affinität von GLUT1 für Glukose nicht vom Lebensalter abhängt (Powers et al., 1998).

GLUT3 ist im Gehirn vorzugsweise in Neuronen enthalten (Maher et al., 1992, 1993, 1994; Bondy et al., 1992; Vannucci & Simpson, 2003). Dagegen konnte GLUT3 nicht in der Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen werden (Bondy et al. 1992, Maher et al. 1993). Vannucci et al. (1994) zeigten, dass GLUT1 und GLUT3 wachstumsreguliert im Rattenhirn vorkommen, dabei wird die GLUT1-Expression positiv vom Wachstums - und Ernährungszustand des Tieres geregelt, während GLUT3 eher durch die funktionelle Aktivität und die neuronale Reifung der Neuronenpopulation positiv gesteuert wird. Der limitierende Faktor für die zerebrale Glukoseutilisation während der Entwicklung ist damit die zelluläre Expression von GLUT3 und nicht der Glukosetransport über die Bluthirnschranke (Vannucci et al., 1994).

2.3 Effekte einer antenatalen Glukokortikoidgabe auf das normoxische Gehirn

2.3.1 Mechanismen der Glukokortikoidwirkung

Bereits höhere physiologische Glukokortikoidblutspiegel, wie sie bei Stress auftreten, führen *in vitro* und *in vivo* zu akuten neurotoxischen Effekten

(McEwen et al., 1995; Sapolsky, 1994) und zu Apoptose (Distelhorst, 2002; Hassan et al., 1996). Unter normalen Bedingungen bindet Kortisol mit einer hohen Affinität an Mineralokortikoidrezeptoren, die vor allem im Hippokampus und im Hypothalamus vorkommen (Ahima et al., 1991; Cintra et al., 1994). Höhere Kortisolspiegel führen jedoch zu einer Sättigung der Mineralokortikoidrezeptoren und zu einer verstärkten Bindung an Glukokortikoidrezeptoren. Das synthetische Glukokortikoid Betamethason ist ein selektiver Agonist intrazellulärer Glukokortikoidrezeptoren mit einer höheren biologischen Potenz als Kortisol (Yang et al., 1990). Aufgrund dessen ist die Aktivierung von Mineralo- und Glukokortikoidrezeptoren in Richtung der Glukokortikoidrezeptoren verschoben.

Im letzten Trächtigkeitsdrittel werden Glukokortikoidrezeptoren im Gehirn von Schafen exprimiert (Rose et al., 1985; Brodhun et al., 2003).

Nach dem klassischen Konzept führt die Aktivierung von Glukokortikoidrezeptoren, welche am Zellkern sitzen, zu einer Genaktivierung oder Genrepression (Evans et al., 1988). Die Glukokortikoideffekte über intrazelluläre Glukokortikoidrezeptoren sind vom Rezeptortyp abhängig (Übersichten in Joels & de Kloet, 1992; 1994). Glukokortikoidrezeptoren, die ubiquitär im gesamten Gehirn vorhandenen sind (Ahima & Harlan, 1990; Cintra et al., 1994), vermitteln neben der Abnahme der neuronalen Erregbarkeit und der katabolen Glukokortikoidwirkung neurotoxische und Apoptose induzierende Effekte im Gehirn von Ratten (Joels und de Kloet, 1992; 1994; Hassan et al., 1996; Packan und Sapolsky, 1990; siehe 2.3.2).

Im Gegensatz dazu haben Mineralokortikoidrezeptoren einen neuroprotektiven Effekt beim adulten Rattengehirn (Hassan et al., 1996). Im Hippokampus, wo neben den Glukokortikoidrezeptoren auch Mineralokortikoidrezeptoren vorkommen, scheinen Glukokortikoide eine koordinierende Kontrolle über die neuronale Erregbarkeit auszuüben (Ahima et al., 1991). Da die Sättigungsgrenze von Mineralokortikoidrezeptoren viel niedriger als die von Glukokortikoidrezeptoren ist, führen niedrige Kortisolspiegel im Bereich der Sättigung der Mineralokortikoidrezeptoren zu einem neuroprotektiven Effekt und hohe Kortisolspiegel über eine verstärkte Aktivierung von

Glukokortikoidrezeptoren zu einem neurotoxischen Effekt (Hassan et al., 1996). Für die Besetzung der Glukokortikoidrezeptoren sind aber schon physiologisch hohe Kortisolspiegel, wie sie bei Stress erreicht werden, ausreichend (Scully und Otten, 1995).

Neben der genomischen Wirkung greifen Glukokortikoide auch an der neuronalen Membran einerseits über vermutete jedoch bisher nicht nachgewiesene Membranrezeptoren oder andererseits direkt durch Veränderungen der Ionenpermeabilität an (Joels & de Kloet, 1994; McEwen et al., 1994; Borski, 2000).

2.3.2 Neurotoxische Glukokortikoideffekte

Schon unter normoxischen Bedingungen sind aus der Literatur neuroprotektive und neurotoxische Effekte einer antenatalen Glukokortikoidgabe bekannt. Einerseits schützen sie vor intraventrikulären Blutungen (Elimian et al., 1999; Leviton et al., 1993), andererseits induzieren antenatale Glukokortikoide eine Verminderung der Neuronenzahl beim adulten Primaten und eine Dendritendegeneration, die im Hippokampus des fetalen als auch des adulten Ratten- und Primatengehirns nachgewiesen wurde (Sapolsky et al., 1990; Scully & Otten, 1995; Uno et al., 1994). Eine Aktivierung von Glukokortikoidrezeptoren durch Dexamethason induziert im sich entwickelnden Primatengehirn eine Degeneration der Dendriten und eine Depletion von Pyramidenzellen im Hippokampus (Uno et al., 1990). Hippokampale Pyramidenzellen, insbesondere die der CA3-Region, reagieren somit hochvulnerabel auf die Exposition von exogenen Glukokortikoiden (Uno et al., 1994). Hier sind die in der Geburtsmedizin verwendeten synthetischen Glukokortikoide mit ihrer hohen Typ-II-Rezeptorspezifität besonders wirksam. Im sich entwickelnden Rattengehirn wurde weiterhin eine glukokortikoidbedingte Hemmung der Neuro- und Gliagenese sowie der Myelinisierung beobachtet (De Kloet et al., 1988, Huang et al, 2001; Brodhun et al., 2004).

Die Dendritendegeneration wiederum ist von einem Verlust von MAPs, die insbesondere in Nervenzellfortsätzen vorkommen (Bershadsky & Vasiliev, 1989; Schwab et al., 2001; Antonow-Schlorke et al., 2003) begleitet. MAPs

lassen sich sowohl bei Schaffeten zum Zeitpunkt 0,87 der Gestationsdauer (Schwab et al., 2001) als auch bei jüngeren Primatenfeten zum Zeitpunkt 0,73 der Gestationsdauer (Antonow-Schlorke et al., 2003) beobachten. Auch ein glukokortikoidbedingter Verlust der synaptischen Dichte bzw. eine Störung der synaptischen Funktion konnte am fetalen Schaf gezeigt werden (Antonow-Schlorke et al., 2002; Colberg et al., 2004).

2.3.3 Glukokortikoideffekte auf den Hirnmetabolismus

Es ist seit längerem bekannt, dass Glukokortikoide katabol auf den peripheren (Munck, 1971) und zerebralen Metabolismus (Landgraf et al., 1978) wirken. Horner et al. (1999) berichten über eine glukokortikoidbedingte Inhibition der Glukoseaufnahme in die hippokampalen Neurone in Zellkultur.

Glukokortikoide vermindern die lokale zerebrale Glukoseutilisation im adulten (Doyle et al., 1994) und neonatalen Rattengehirn (Tuor et al., 1997) möglicherweise aufgrund eines erniedrigten Energiebedarfes. Unsere Arbeitsgruppe konnte weiterhin zeigen, dass Betamethason in der klinisch verabreichten Dosis zu einer Senkung der Enzymaktivitäten von Atmungskettenenzymen beim fetalen Schaf führt (Schwab et al., 2005).

2.3.4 Glukokortikoideffekte auf die Hirndurchblutung

Eine Adrenalektomie führte im adulten Rattengehirn zu einer Steigerung der Durchblutung in Hippokampus und Kortex (Endo et al., 1994). Umgekehrt konnte eine Senkung der Durchblutung im Hippokampus durch eine Langzeitbehandlung von Ratten mit Glukokortikoiden gezeigt werden, welche mit schweren histologischen Schäden einher ging (Endo et al., 1997). Denn die durch Glukokortikoide vermittelte Steigerung der Glukosefreisetzung aus der Leber führte *in vivo* zu einem erhöhten Plasmaglukosespiegel (Hall, 1993). Die katabolen Glukokortikoidwirkungen könnten möglicherweise eine sekundäre Senkung der Hirndurchblutung erklären, da die zerebrale Perfusion eng an den zerebralen Stoffwechselbedarf gekoppelt ist (Iadecola, 1993).

Durch unsere Arbeitsgruppe konnten schließlich direkte Effekte einer antenatalen Glukokortikoidbehandlung auf das zerebrovaskuläre System des Schaffeten *in utero* nachgewiesen werden. Dabei kam es im letzten Trimenon

beim fetalen Schaf nach einer 24 stündigen Betamethasonapplikation zu einem signifikanten Abfall der fetalen Hirndurchblutung unabhängig von der Reifung der HHN-Achse (Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren-Achse) und zu einer Störung der zerebralen Autoregulation (Schwab et al., 2000; Löhle et al., 2005)

2.4 Effekte einer antenatalen Glukokortikoidgabe auf das hypoxische Gehirn

2.4.1 Pathophysiologie perinataler Hirnschäden

Aufgrund eines hypoxisch-ischämischen Insultes in der Perinatalzeit erleiden in Deutschland ca. 1000 Kinder jährlich einen Hirnschaden (Jensen et al., 2003). Ursächlich für die zugrunde liegende intrauterine Asphyxie sind eine uterine oder umbilikale Minderdurchblutung oder Plazentainsuffizienz (Berger & Garnier, 1999). Je nach Lokalisation und Schwere des Insultes erleiden diese Kinder einen perinatalen Tod oder entwickeln spastische Paresen, Choreoatetosen, Ataxien und sensomotorische Integrationsstörungen (Volpe, 1995). Spätschäden im auditiven und visuellen System sowie Beeinträchtigungen der intellektuellen Leistungsfähigkeit sind ebenfalls zu beobachten (Berger & Garnier, 1999).

Für perinatale hypoxische Schädigungen erwies sich das Gehirn als sensibelstes Organ (Towbin, 1998). Nach Towbin existieren zwei vom Gestationsalter abhängige Schädigungsmuster einer hypoxischer Hirnschädigung. Demnach entsteht der Hypoxieschaden bei menschlichen Frühgeborenen vor der 37. SSW primär in periventrikulären Schichten und in angrenzenden Basalganglien. Hingegen ist der Hirnschaden beim reifen Neugeborenen nach der 37. SSW primär im zerebralen Kortex lokalisiert.

Der bestimmende Hauptfaktor für die Lokalisation der Hirnschädigung ist die An- oder Abwesenheit der germinalen Matrix, eine unreife, metabolisch aktive Schicht reich an vaskularisierten neuroepithelialen Zellen, die beim Menschen zwischen der 23. und 32. GW (0,6 bis 0,84 der Gestationsdauer) besteht (Volpe et al., 2000). Die germinale Matrix befindet sich im Subependym der Ventrikelwand und bildet die Neurone und Gliazellen, die dann zum zerebralen

Kortex wandern und diesen besiedeln. Die Gefäße dieser Schicht sind lediglich mit einem einschichtigen Endothel ausgekleidet und damit besonders vulnerabel für hypoxisch-ischämische Insulte und Blutdruckschwankungen. D.h. zu den häufigsten und wichtigsten neurologischen Insulten des Frühgeborenen vor der 34. SSW gehören die germinale Matrixhämorrhagie (GMH) und die intraventrikuläre Hämorrhagie (IVH) (Paneth et al., 1993). Mangels der Fähigkeit des Frühgeborenen die zerebrale Perfusion zu autoregulieren, können Anstiege in Blutdruck und Blutfluß die fragilen Gefäße der germinalen Matrix zerreißen. Die Zellen der germinalen Matrix sind reich an Mitochondrien und damit sehr sensibel gegenüber Ischämie. Die Involution der germinalen Matrix ist mit der 32. GW vollständig beendet (Hambleton et al., 1976). Deshalb haben Frühgeborene ab der 34. SSW nur noch ein geringes Risiko für intraventrikuläre Blutungen. Eine weitere typisch hypoxisch-ischämische Hirnläsion des unreifen Feten ist die periventrikuläre Leukomalazie, eine Schädigung der weißen Substanz dorsal und lateral der Seitenventrikel (Larroche, 1977; Norman, 1978).

Es ist bekannt, dass sich die Distribution der zerebralen Durchblutung nach der 32. SSW in Vorbereitung auf das extrauterine Leben zugunsten des stoffwechselaktiven zerebralen Kortex ändert (Szymonowicz et al., 1998). Somit nimmt auch die Vulnerabilität der grauen Substanz bei menschlichen Feten zu (Barkovich et al., 1992). Beim reifen menschlichen Feten sind selektive neuronale Zelluntergänge vor allem im Hippokampus und im parasagittalen Kortex zu beobachten, wobei das Verteilungsmuster der Zelluntergänge stark perfusionsabhängig ist (Berger & Garnier, 1999).

Die Abgrenzung des geschädigten vom gesunden Gewebe erfolgt z.B. in der Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE) vor allem nach folgenden Kriterien: Akute hypoxische Nervenzellveränderungen sind per definitionem Koagulationsnekrosen von Einzelzellen. Sie sind gekennzeichnet durch eine Pyknose und Kondensation des Nukleus, der häufig dreiecksförmig imponiert, sowie durch eine Eosinophilie des Zytoplasmas. Bei einem älteren Geschehen zeigt sich dann eine beginnende Pseudozysten (Vakuolen) -bildung. Das

Gewebe imponiert aufgelockert, zum Teil abgeräumt mit möglichen Mikroblutungen im Rahmen des Infarktes (Castillo-Melendez et al., 2004).

Die parasagittale Kortexschädigung ist eine spezifisch pathologische Läsion, die in reifen Neugeborenen auftritt, welche an hypoxisch-ischämischer Enzephalopathie leiden. Sie ist definiert durch die Präsenz kortikaler und subkortikaler Nekrosen vor allem in den parietalen und okzipitalen Regionen (Berger & Garnier, 1999).

In tierexperimentellen Studien am fetalen Schaf gelang es, diese Schädigungsformen zu reproduzieren (Berger & Garnier, 1999). Das morphologische Resultat, das nach einem ischämischen Insult zurückbleibt, ist abhängig von Dauer und Schwere der Ischämie sowie der Reife des betroffenen Feten. Insgesamt scheint das Gehirn unreifer Schaffeten weniger vulnerabel gegenüber einer Asphyxie zu sein (Mallard et al., 1994).

Nach 10, 15 und 20 Minuten globaler Asphyxie, induziert durch totale Nabelschnurokklusion, zeigten sich zwar keine neuronalen Zellschäden im Hippokampus bei Schaffeten mittleren Gestationsalters (0,6 der Gestation) jedoch bei Tieren späteren Gestationsalters (0,9 der Gestation) (Keunen et al., 1997). An fetalen Schafen am 124. Tag Trächtigkeitsalter postulierten Fujii et al. (2003) einen neuronalen Zellschaden nach 10 Minuten Nabelschnurokklusion im Hippokampus. Neben pyknotischen Zellen in der CA1- und der CA3-Region des Hippokampus fanden sich nach 10 minütiger Nabelschnurokklusion am fetalen Schaf späten Gestationsalters auch im parietalen Kortex, Putamen, Striatum und in den Purkinjezellen des Zerebellums selektive Nekrosen (Castillo-Melendez et al., 2004). Duncan et al. (2004) zeigten unter gleichen Bedingungen keinen signifikanten Zellschaden. Den Effekt intermittierender asphyktischer Episoden untersuchten auch Mallard (1993, 1995, 2003) nach sowohl 3 x 10 min als auch 4 x 5 min Nabelschnurokklusion an 123 – 130 dGA (Tage Gestationsalter bei einer Gestationsdauer von 150 Tagen; entspricht 0,82 – 0,86 der Gestationsdauer fetalen Schafen. Jedoch zeigte sich eine Verteilung der neuronalen Schäden mit Bevorzugung des Striatums (Mallard et al., 1993; 1995; 2003). Das Modell repetitiver Okklusionen der Nabelschnur am fetalen Schaf resultierte auch in

Schäden der periventrikulären weißen Substanz sowie Läsionen im Thalamus und im Kortex in Abhängigkeit vom Gestationsalter (Ohyu et al., 1999, Marumo et al., 2001). Tunel-positive Zellen, welche den apoptotischen Zelltod markieren, waren bei Schaffeten (130 dGA) nach intermittierenden Nabelschnurokklusionen über 3 - 5 h in Zerebellum, Pons, Kortex und Hippokampus zu beobachten (Falkowski et al., 2002). Am 129. dGA (0,86 Gestationsdauer) hatte ein erzeugter ischämischer Hirnschaden am chronisch instrumentierten Schaffeten durch Okklusion beider Aa. carotis für 30 Minuten einen neuronalen Zellschaden im parasagittalen Kortex und im Hippokampus zur Folge (Berger & Garnier, 1999). Weiterhin nahm der neuronale Zellschaden von parasagittal nach temporal deutlich ab (Berger & Garnier, 1999).

In den letzten Jahren hat sich die Erkenntnis gefestigt, dass die Mehrzahl der hypoxisch-ischämischen Hirnschäden nicht Folge einer geburtsassoziierten Asphyxie sind, sondern vielmehr antepartal entstehen können, z.B. aufgrund von rezidivierenden Nabelschnurkompressionen bei Oligohydramnie, fetaler Wachstumsretardierung, fetaler Hämorrhagie, Herzrhythmusstörungen sowie aufsteigender intrauteriner Infektionen (Schiffrin, 1995, Berger et al., 2002).

2.4.2 Morphologische Effekte einer Ischämie auf MAP1B und MAP2

Eine Verringerung des dendritischen MAP2 gilt als früher Marker einer hypoxisch-ischämischen neuronalen Schädigung des adulten (Matesic & Lin, 1994; Schwab et al., 1998) und des neonatalen Rattengehirns (Malinak & Silverstein, 1996; Blomgren et al., 1995; Ota et al., 1997). Für das vor allem axonal lokalisierte MAP1B konnte ebenfalls ein früher Verlust der Immunreaktivität nach einer fokalen zerebralen Ischämie bei adulten Ratten nachgewiesen werden (Dewar & Dawson, 1997).

2.4.3 Morphologische Effekte einer Ischämie auf Synaptophysin

Im erwachsenen Gehirn wurde demonstriert, dass Synaptophysin besonders vulnerabel gegenüber einer zerebralen Ischämie ist (Martinez et al., 1997). Bisher sind in der Literatur jedoch keine Zusammenhänge am fetalen Gehirn in Bezug auf Hypoxie und Synaptophysin untersucht worden.

2.4.4 Morphologische Effekte einer Ischämie auf GLUT1 und GLUT3

GLUT1 und GLUT3 reagieren empfindlich auf eine zerebrale Ischämie im juvenilen (Vannucci et al., 1996, 1998) und im adulten Rattengehirn (Harik et al., 1994; McCall et al., 1995). An 7 Tage alten Ratten führte ein hypoxisch-ischämischer Hirnschaden innerhalb von 4h zu einer Hochregulation von GLUT1 und GLUT3 in der ischämischen als auch der nicht-ischämischen Hemisphäre (Vannucci, 1996). 72 h nach dem Ereignis stellte sich ein Anstieg von GLUT1 nur noch in der ischämischen Hemisphäre dar, demgegenüber zeigte sich ein Abfall für GLUT3. Eine chronische mütterliche Hypoxie führte zu einem Anstieg von GLUT1-mRNA im fetalen Rattengehirn (Xia et al., 1995). Nach einer 6 minütigen Ischämie wurde ebenfalls ein Anstieg von GLUT1- und GLUT3-mRNA bei Ratten 24 h nach dem Ereignis beobachtet (Gerhart et al., 1994). Die Autoren geben jedoch keine Auskunft über Änderungen des Proteingehalts. Demgegenüber wurde ein Abfall von GLUT1 in menschlichen Babies mit der post-mortalen Diagnose einer periventrikulären Leukomalazie gezeigt, allerdings mit dem im Vergleich zum Tierexperiment naturgemäß großen zeitlichen Abstand zwischen Tod und Fixierung der Gehirne (Nakai et al., 2002).

2.4.5 Glukokortikoideffekte auf eine durch perinatale Asphyxie hervorgerufene Hirnschädigung

Zu den Glukokortikoideffekten auf eine perinatale hypoxisch-ischämische Hirnschädigung liegen widersprüchliche Ergebnisse vor, die vor allem am Modell der neonatalen Ratte gewonnen wurden. So werden sowohl neuroprotektive als auch die Schädigung verstärkende Effekte gezeigt.

Neuroprotektive Effekte

Eine pränatale Glukokortikoidgabe bei Kindern mit einem extrem niedrigen Geburtsgewicht scheint mit einem verringerten Risiko für eine spastische Zerebralparese einherzugehen (Vohr et al. 2005). An 7 Tage alten Ratten konnte gezeigt werden, dass Dexamethason in einer niedrigen Dosierung ($0,01 \text{ mg kg}^{-1}\text{d}^{-1}$) einen durch unilaterale Okklusion der A. carotis communis

hervorgerufenen Gehirnschaden reduziert (Liu et al., 1995, Tuor et al., 1995). Jedoch beträgt die klinisch gebräuchliche Dosis zur Induktion der fetalen Lungenmaturation $0,17 \text{ mg kg}^{-1}\text{d}^{-1}$ oder 12 mg für eine 70 kg schwere Schwangere, eine 17 -fach höhere Konzentration als die in der Studie genutzte Dosis (Ballabh et al., 2001; Ballard et al., 1975). Ebenso sind diese Effekte offenbar altersabhängig. Ratten im Alter von einem Monat, wenn die Myelinisierung und die Synaptogenese abgeschlossen sind, wurden nicht mehr geschützt (Tuor et al., 1997). Möglicherweise trägt als Ursache der Neuroprotektion die Aufrechterhaltung der zerebralen Glukoseutilisation bei erhöhten Blutglukosespiegeln durch die glukokortikoidbedingte Glukoneogenese, Glykolyse, Ketogenese und Lipolyse bei (Tuor et al., 1997).

Eine Hirnschädigung verstärkende Effekte

Auf der anderen Seite wurde eine Verstärkung der Hirnschädigung nach einem hypoxisch-ischämischen Ereignis durch Glukokortikoide sowohl bei adulten (Koide et al., 1986) als auch bei neonatalen Ratten (Carlos et al., 1991; Kauffman et al., 1994; Sapolsky & Pulsinelli, 1985) gezeigt. Die Exposition von Astrozyten von fetalen Ratten gegenüber Kortikosteron (dem natürlich vorkommenden Glukokortikoid bei Ratten, welches dem Kortisol beim Menschen entspricht) bewirkte ebenfalls eine Verstärkung des Hypoxieschadens (Tombaugh et al., 1992). Wahrscheinliche Ursache ist eine glukokortikoidbedingte verstärkte NMDA-Rezeptor vermittelte Neurotoxizität über eine Erhöhung der extrazellulären Konzentration exzitatorischer Aminosäuren (McEwen, 1994). Möglicherweise liegt dies in der Hemmung der Glutamataufnahme durch die Gliazellen begründet (Virgin et al., 1991). Folglich bewirkt der Anstieg des freien zytosolischen Ca^{2+} eine Aktivierung von Proteasen und Endonukleasen sowie die durch die Freisetzung freier O_2 -Radikale typischen Schäden des Zentralnervensystems (ZNS) (Reagan & McEwen, 1997). Weiterhin könnte eine glukokortikoidbedingte Verminderung der Glukoseaufnahme in die Zelle in Phasen eines verminderten Substratangebotes, wie während einer Hypoxie, die neuronale Zellschädigung verstärken (Sapolsky & Pulsinelli, 1985). Die verminderte Glukoseutilisation

kann zum vorzeitigen Auftreten von ischämischen Depolarisationen führen (Adachi et al., 1998), welche wiederum zu einer Verstärkung der neuronalen Schädigung führen. Gleichzeitig führen Glukokortikoide zu einer Glukosefreisetzung *in vivo*. Eine Hyperglykämie verstärkt die ischämische neuronale Schädigung im adulten Gehirn durch eine verstärkte Laktatazidose infolge der gesteigerten anaeroben Glykolyse (Pulsinelli et al., 1982), wirkt aber andererseits bei neonatalen Ratten protektiv (Tuor et al., 1997).

2.5 Zielstellung

Zu den Glukokortikoideffekten in pharmakologischen Dosen auf eine perinatale hypoxisch-ischämische Hirnschädigung liegen widersprüchliche Ergebnisse vor (siehe 2.4.5). In der Literatur werden sowohl neuroprotektive Glukokortikoideffekte als auch die hypoxisch-ischämische Schädigung verstärkende Effekte beschrieben (siehe 2.4.5). Die hauptsächlich am neonatalen Rattenmodell gewonnenen Ergebnisse sind insgesamt nur sehr eingeschränkt auf den Menschen übertragbar, da sich die Gehirnentwicklung der Ratte im Gegensatz zum Menschen vorrangig postnatal vollzieht und die in den Studien verwendeten Glukokortikoiddosen zum Teil stark von den klinisch gebräuchlichen abweichen (siehe 2.4.5).

Im Gegensatz dazu gilt das fetale Schaf als etabliertes tierexperimentelles Modell für die menschliche Fetalperiode, dessen zeitlicher Verlauf der Hirnentwicklung, wenn auch etwas reifer zur Geburt, ähnlich dem Menschen ist. Hier lässt sich eine fetale Asphyxie mit einem Schädigungsmuster auslösen, welches dem des Menschen weitgehend entspricht (siehe 2.4.1).

Um die genannten widersprüchlichen Ergebnisse zu den Glukokortikoideffekten auf eine hypoxisch-ischämische Hirnschädigung aufzulösen und ihre klinische Bedeutung zu eruieren, war es Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von Glukokortikoiden in der Dosis, wie sie klinisch zur Förderung der fetalen Lungenreifung angewendet wird, auf die Gehirnschädigung nach einer Asphyxie am instrumentierten Schaffeten unter Prüfung folgender Hypothesen zu analysieren:

1. Im Gegensatz zu den widersprüchlichen (neuroprotektiv versus schädigend) Effekten bei der neonatalen Ratte verstärkt Betamethason einen hypoxischen Hirnschaden *in utero*, da Glukokortikoide schon auf das fetale normoxische Gehirn neurotoxisch wirken (siehe 2.3.2).
2. Ein Mechanismus für eine glukokortikoidbedingte Verstärkung der Hirnschädigung ist eine hemmende Wirkung der Glukokortikoide auf die gesteigerte zerebrale Glukoseaufnahme nach einer Asphyxie, die am Modell der neonatalen Ratte nachgewiesen wurde (siehe 2.4.5).
3. Die hemmende Wirkung der Glukokortikoide auf die zerebrale Glukoseaufnahme wird durch eine Hemmung von GLUT1 und GLUT3 vermittelt, da die zerebrale Glukoseaufnahme selektiv über Glukosetransportproteine reguliert wird. GLUT1 ist dabei umsatzlimitierend in der BHS, während GLUT3 die Glukoseaufnahme in die Neurone beschränkt (siehe 2.2.3). Mit diesen Untersuchungen kann auch die Vermutung überprüft werden, ob der katabole Glukokortikoideffekt zumindest teilweise auf einer Hemmung des Glukosetransportes in die Neurone beruht.

Zur Prüfung der Hypothesen wurde das kliniknahe Tiermodell „chronisch instrumentiertes fetales Schaf“ gewählt, an dem im Alter von 126 ± 1 dGA (0,84 der Gestationsdauer bei einer Gestationsdauer von 150 Tagen) eine 4 x 4 minütige komplette repetitive Okklusion der Nabelschnur im Abstand von 30 Minuten, als Modell einer häufigen Ursache für eine fetale Asphyxie, induziert wurde (siehe 2.4.1). Diese führt beim fetalen Schaf zu einem reproduzierbaren Hirnschaden ohne dass der Fetus an der Asphyxie verstirbt (eigene Voruntersuchungen).

Die Untersuchungen sollen dazu beitragen, die Entscheidung in der Praxis zu einer antenatalen Glukokortikoidgabe unter Berücksichtigung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses abzuwägen.

3 Material und Methoden

3.1 Experiment

3.1.1 Experimentelles Protokoll

Die Genehmigung der Untersuchungen erfolgte durch die Tierschutzkommission des Landes Thüringen. Alle dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente fanden am Institut für Versuchstierkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena statt. Als Versuchstiere dienten insgesamt 21 trächtige Schafe gekreuzt aus den Rassen Merino- und Schwarzkopfschaf.

Die Tiere wurden zur Gewährleistung eines exakt bekannten Gestationsalters biotechnisch terminiert verpaart, im Freiland beim Züchter gehalten und mindestens 5 Tage vor dem geplanten Operationstermin in das Institut für Versuchstierkunde gebracht. Nach der Ankunft im Institut für Versuchstierkunde erfolgte die Haltung in einem abgeschlossenen Tierstall unter standardisierten Bedingungen (12 h Licht, 12 h Dunkelheit, 20°C Raumtemperatur) bei freiem Zugang zu Futter und Wasser. So konnte das Muttertier an die veränderte Umgebung adaptieren. Die chronische Instrumentierung erfolgte am 120 ± 1 dGA (0,8 der Gestationsdauer) (siehe Abb. 1). Nach der Operation und einer postoperativen Erholungsphase wurde am 125 ± 1 dGA (0,84 der Gestationsdauer) die Infusion mit isotonischer Kochsalzlösung oder Betamethason i.v. über 48 h begonnen. 24 h nach Beginn der Infusion wurde eine 4 x 4 minütige Nabelschnurokklusion im Abstand von 30 Minuten durchgeführt. Weitere 24 h danach, um eine Regulation der zu untersuchenden Proteine abzuwarten, und somit unmittelbar nach Ende der Infusion wurden die fetalen Gehirne perfusionsfixiert (siehe Abb. 1).

Aufgrund des komplizierten Tiermodells waren für die chirurgische Instrumentierung 3 sterile und 1 unsteriler Mitarbeiter und zur Durchführung der Experimente sowie Perfusion der fetalen Gehirne 2 Mitarbeiter notwendig. Neben der histologischen Aufarbeitung und Auswertung für alle Tiere beteiligte ich mich an der chirurgischen Instrumentierung, der Durchführung der Experimente sowie Perfusionsfixation der fetalen Gehirne.

Die Versuchstiere wurden in drei Gruppen randomisiert:

- 1.) scheinoperierte Schaffeten: mit ihnen wurde das experimentelle Protokoll unter Ausschluß der Nabelschnurokklusion durchgeführt (n=7).
- 2.) Kontrolltiere: Durchführung einer Nabelschnurokklusion während einer Infusion mit isotonischer Kochsalzlösung (n=7).
- 3.) Betamethason – behandelte Feten: Durchführung einer Nabelschnurokklusion während einer Betamethasoninfusion (n=7).

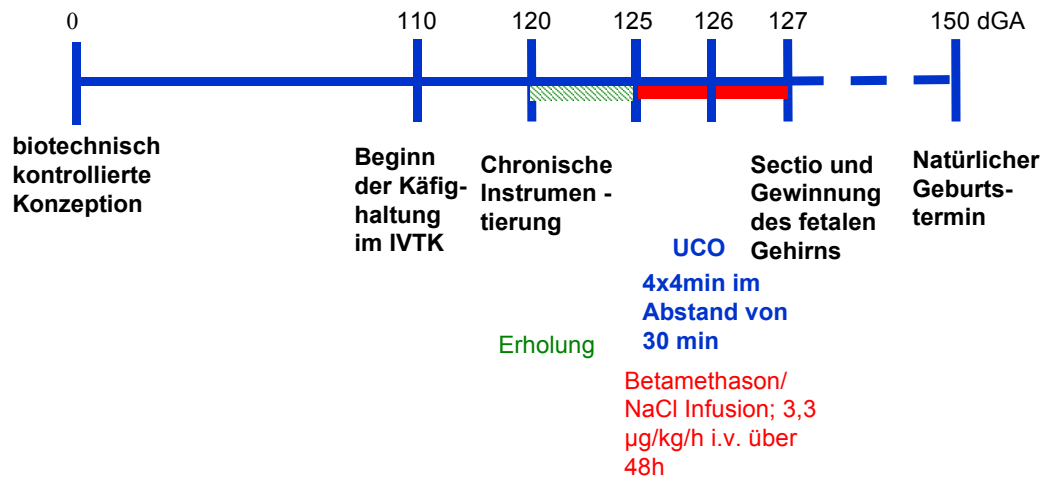


Abb.1 Übersicht des experimentellen Protokolls.

3.1.2 Chirurgische Instrumentierung der Feten

Am 120 ± 1 dGA (0,8 der Gestationsdauer) wurde der Schaffet unter sterilen Bedingungen mit Sonden und Kathetern chronisch instrumentiert.

Zur Prämedikation bekam das Muttertier 0,05% Atropin (Atropinsulfat, B. Braun, Melsungen, Deutschland) i.m. injiziert. Die Anästhesie wurde mit 10% Ketamin (Atarost, Deutschland) i.m. eingeleitet und mit dem Inhalationsanästhetikum Halothan 5% (Fluothan, Zeneca, Deutschland) fortgesetzt. Dann wurde dem Mutterschaf zur Entnahme von Blutproben ein Katheter in die linke A. carotis communis und zur postoperativen Antibiotikaphylaxe und Schmerzmedikation ein zweiter Katheter in die linke Vena jugularis interna eingesetzt.

Zeitgleich wurde der Fetus durch einen abdominalen Median- und anschließenden Uterusschnitt entwickelt. Polyvenylkatheter (Polyvenyl-Katheter, Rüsche, Rüsche, Deutschland; 0,1 mm Innen- und 0,18 mm Außendurchmesser) wurden zur Blutentnahme in der linken Arteria carotis interna, zur Betamethasongabe in der Vena jugularis, zur Mikrosphärenapplikation in der Vena saphena magna und zur

Aufzeichnung des hydrostatischen Druckes in der Amnionhöhle platziert. Zur elektrokortikographischen Ableitung wurden Messingelektroden biparietal und bifrontal nach Freilegung der Kalotte in die Schädelknochen implantiert und mit einem Kaltpolymerisat (Kallocryl, Laborchemie Apolda, Deutschland) fixiert. Weitere Edelstahlelektroden zur Aufzeichnung des fetalen EKG wurden an der Muskulatur beider Schultern und am Sternum befestigt, sowie in die Uterusmuskulatur zur Aufzeichnung der Uteruskontraktionen eingenäht. Diese Daten sind Gegenstand einer separaten parallelen Arbeit.

Bei den Kontrolltieren sowie den Feten der behandelten Gruppe wurde zur Kompression der Nabelschnur ein Gefäßokkluder (Typ OC20HD, In Vivo Metrics, Healdsburg, California, USA) an der proximalen Nabelschnur angebracht und am fetalen Abdomen befestigt.

Alle Ableitungsdrähte und Katheter wurden mittels Flankenschnitt nach außen verlegt und an externe Messgeräte angeschlossen. Im Anschluß an die OP wurde das Muttertier in den Käfig zurückgebracht und der Zugang ad libitum gewährt. Alle Schafe erhielten eine Antibiotikaprophylaxe über 3 Tage in einer täglichen Dosis von 0,5 g Ampicillin i.v. (Ampicillin, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) zur Behandlung der Mutter und 0,5 g Ampicillin in die Amnionhöhle zur Behandlung des Feten. Zusätzlich wurden 5 - 8 g d⁻¹ Metamizol i.v. zur postoperativen Analgesie für die Dauer von 3 Tagen verabreicht. Alle Katheter wurden mit 0,5 ml h⁻¹ Heparinlösung (12,5 IE/ ml in 0,9 % NaCl) regelmäßig gespült.

3.1.3 Durchführung der fetalen Asphyxie

Die Experimente wurden nach einer Erholungszeit von mindestens 3 postoperativen Tagen am chronisch instrumentierten, nicht anästhesierten Feten *in utero* durchgeführt. Die Experimente umfassten einen Zeitraum von 3 Tagen und begannen jeweils 9 Uhr morgens, um zirkadiane Effekte, denen die endogene Glukokortikoidsynthese unterworfen ist, auszuschließen. Ein kontinuierliches Monitoring der Herzfrequenz, des Elektrokortikogramms, des arteriellen Blutdruckes, des EKG und der Uteruskontraktionen dienten der Überwachung. Tägliche fetale und maternale arterielle Blutproben wurden um 9:00 Uhr zur Überprüfung der Blutgase und des pH – Wertes entnommen und am Blood Gas Analyzer (ABL715, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) gemessen. Die Sauerstoffsättigung wurde photometrisch (Hemoximeter OSM2, Radiometer) bestimmt.

Am 125 dGA erfolgte die Infusion von isotonischer Kochsalzlösung bei den scheinoperierten Feten und der Kontrollgruppe. Die behandelte Gruppe erhielt Betamethason (n=7, Celestan solubile Essex, München, Deutschland). Wie vom NIH empfohlen, wurde Betamethason über 48 Stunden verabreicht. Um mögliche Effekte einer unterschiedlichen Passage über die ovine und die humane Plazenta zu vermeiden, wurde Betamethason direkt in die fetale Vena jugularis mit einer Rate von $3,3 \mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ infundiert. Die erreichte fetale Plasmakonzentration (Schwab et al., in press; Derks et al., 1997) glich der in der humanen Nabelschnur gemessenen Konzentration nach mütterlicher Betamethasonbehandlung (Derks et al., 1997; Kream et al., 1983; Petersen et al., 1980).

Am darauf folgenden $126. \pm 1$ dGA (0,84 der Gestationsdauer) wurde am Feten eine 4 x 4 minütige totale Nabelschnurokklusion im Abstand von 30 Minuten durchgeführt. Die Nabelschnurgefäße wurden durch Luftfüllung des Nabelschnurokkluders vollständig komprimiert.

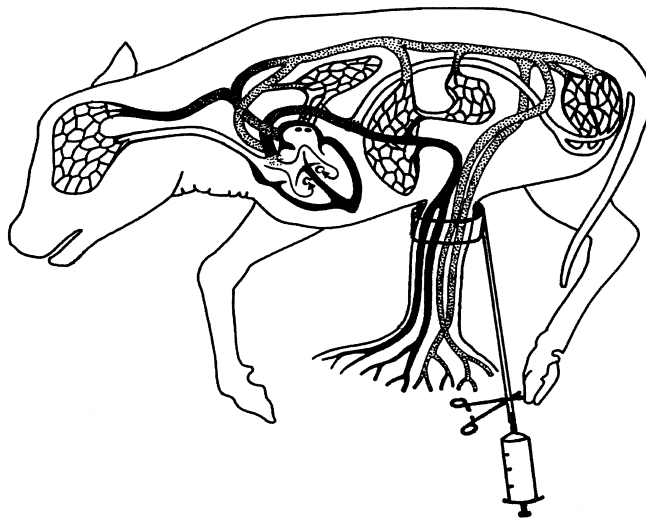


Abb.2 Darstellung eines Schaffeten mit Nabelschnurokkluder. Dieser wird für die Dauer der Nabelschnurokklusion luftgefüllt und abgeklemmt.

Zur Kontrolle der Feten und der Nabelschnurokklusionen wurden die arteriellen Blutgase, die Glukose und das Laktat bestimmt. Die Blutentnahmen von etwa 0,2 ml erfolgten zu definierten Zeitpunkten: ein Ausgangswert vor Beginn der NaCl – oder Betamethasoninfusion, ein 24 h Wert nach Beginn der Infusion sowie 5 min vor und jeweils 3 min nach Beginn der Nabelschnurokklusionen. In der individuellen

Gesamtbewertung der Blutgase bedeutet eine Sauerstoffsättigung unter 20 - 25% und ein Abfall des pH-Wertes auf 6,9 – 7,2 eine vollständige Nabelschnurokklusion und damit eine Asphyxie der Feten beider Versuchsgruppen. Zur Bewertung des Grades der Asphyxie unmittelbar während der Experimente waren ein signifikanter Blutdruckanstieg sowie ein Abfall der Herzfrequenz um 40 - 50% eine hilfreiche Orientierung.

Zum Monitoring der Erholung von den Nabelschnurokklusionen wurden zwei weitere Blutproben 2 h und 24 h nach den Nabelschnurokklusionen bestimmt.

3.2 Histochemische und immunhistochemische Untersuchungen

3.2.1 Perfusion und Vorbereitung der Gehirne

24 Stunden nach der letzten Nabelschnurokklusion und unmittelbar am Ende der Betamethason- bzw. NaCl-Applikation wurde das Mutterschaf mit 1 g Ketamin prämediziert, die Anästhesie mittels 4% Halothan eingeleitet und fortgesetzt, das Abdomen mit einem Medianschnitt eröffnet und ein Uterusschnitt zur Entwicklung des Feten gesetzt. Nach der Entwicklung des Feten und Tötung durch Exsanguination wurde das fetale Gehirn über einen kranial in die rechte Arteria carotis communis vorgeschobenen Katheter mit heparinisierter isotonischer Kochsalzlösung blutleer gespült und dann mit neutral gepufferter 4% Paraformaldehydlösung perfusionsfixiert. Nach Bestimmung des Körpergewichtes wurden zunächst die korrekte Lage der Katheter im Körper des Feten kontrolliert und anschließend Organproben zur weiteren Aufarbeitung entnommen. Die Muttertiere wurden mittels intravenöser Pentobarbitalapplikation (Narcoren, Aventis, Deutschland) getötet. Danach wurden die Gehirne aus der Kalotte freipräpariert und 1 Woche bei 4°C im gleichen Fixativ nachfixiert. Die zur histologischen Aufarbeitung ausgewählte Hemisphäre wurde in 7 mm dicke koronar geschnittene Blöcke geteilt und in Paraffin eingebettet. 6 µm dicke Gewebsschnitte (Rotationsmikrotom, HM 335E, Microm, Deutschland) wurden auf mit Vectabond TM Reagent (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) vorbehandelte Objektträger (SuperFrost, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen und bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Für die histologische Charakterisierung (HE) und die Immunmarkierungen (MAP1B, MAP2, Synaptophysin, GLUT1 und GLUT3) wurden aufeinander folgende Schnitte jeder zu untersuchenden Gehirnregion verwendet.

3.2.2 Histologischer und Immunhistochemischer Nachweis der Hirnschädigung

Zum immunhistochemischen Nachweis von MAP1B, MAP2, Synaptophysin, GLUT1 und GLUT3 wurde die ABC-Methode (Vectastain Elite Kit, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) wie folgt durchgeführt. Jeder histologische Schnitt wurde durch eine absteigende Alkoholreihe, beginnend mit 2 x 10 min in Xylolersatz (Neoclear, Merck, Darmstadt, Deutschland) 2 x 5 min in 100% Alkohol, 5 min in 80% Alkohol und weitere 5 min in 50% Alkohol (Isopropanol, Fluka, Buchs, Schweiz) entparaffiniert. Zur Inhibition endogener Peroxidasereaktionen wurden die Präparate 20 min in 0,6% Wasserstoffperoxid (Tab.2) inkubiert und danach 10 Minuten in Aqua dest gespült. Durch Inkubation der Schnitte in 0,5% Natriumborhydrid (Tab.2) erfolgte die Blockierung reaktiver Aldehydgruppen. Nach dem Spülen mit Arbeitspuffer (Tab.2) wurde mit Normalserum 30 min bei 37° C im Brutschrank inkubiert, um unspezifische Bindungsplätze zu besetzen. Der primäre Antikörper wurde in spezifischer Verdünnung (Tab.1) aufgebracht und über 12 Stunden bei einer Temperatur von 4°C belassen. Nach kurzem wiederholten Spülen mit Arbeitspuffer, erfolgte das Auftragen des biotinylierten sekundären Antikörper (Anti-Mouse IgG, Anti-Rabbit IgG, Vectastain, Vector Labs, Burlingame, CA, USA, Tab.1) und eine Inkubation für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank. Wiederholt wurde mit AP gespült. Der nun folgende ABC-Komplex (Vectastain ABC Reagent, Vector Labs, Burlingame, Kanada) aus Reagenz A (Avidin) und B (biotinylierte Enzyme) (Tab.2) wurde 1 h bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Die nachfolgenden Spülvorgänge für jeweils 5 min mit Puffer beseitigten die überschüssigen Komplexe. Als chromogene Substratlösung zur Visualisierung der immunhistochemischen Reaktion diente DAB (Sigma Fast 3,3'-Diaminobenzidine Tablet Sets, Sigma-Aldrich-Chemie, Sternheim, Deutschland, Tab.2). Das Reaktionsprodukt ist ein dunkelbraunes, amorphes, in Wasser und Ethanol unlösliches Präzipitat. Nach Abspülen in Aqua dest erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte dehydriert und abschließend mit dem Eindeckmedium (Neo-Mount, Merck, Darmstadt, Deutschland) unter einem Deckgläschen konserviert. In Negativkontrollen wurden die primären Antikörper durch das Aufbringen von Normalserum in gleicher Konzentration von der jeweiligen Spezies, aus der der primäre Antikörper stammte, ersetzt.

Primär-Anti-körper	Verdün-nung	Hersteller	Normalserum	Sekundär-Antikörper
MAP1B	1:500	Sigma-Aldrich, Sternheim, Deutschland	Pferdeserum	Anti-Maus IgG
MAP2	1:500	Sigma-Aldrich, Sternheim, Deutschland	Pferdeserum	Anti-Maus IgG
Syn	1:2000	Sigma-Aldrich, Sternheim, Deutschland	Pferdeserum	Anti-Maus IgG
GLUT1	1:1500	Chemicon , Temecula, CA; USA	Ziegenserum	Anti-Kaninchen IgG
GLUT3	1:300	Chemicon, Temecula, CA; USA	Ziegenserum	Anti-Kaninchen IgG

Tab 1. Verdünnungen der verwendeten Antikörper

<i>PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2</i>	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	1,15 g	Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O ₂
	0,2 g	KH ₂ PO ₄
	1000 ml	Aqua dest.
<i>Arbeitspuffer, pH 7,4</i>	auf 500 ml	PBS
	2,5 g	Rinderserumalbumin
	250 µl	Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate (Tween 20)
	5 µl	Triton-X-100
<i>ABC-Komplex (Vectastain Elite Kit, Vector Labs, Burlingame, CA, USA)</i>	auf 1 ml	Arbeitspuffer + Triton
	40 µl/ml	ABC-Komplex
<i>DAB (3`3 Diaminobenzidin, Sigma-Aldrich-Chemie, Sternheim, Deutschland))</i>	0,7mg/ml	DAB
	0,2mg/ml	H ₂ O ₂ (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
	5 ml	Aqua dest.

<i>Hämatoxylin nach Meyer</i>	1 g	Hämatoxylin (Fluka, Buchs, Schweiz)
	1000ml	Aqua dest.
	200 mg	Natriumjodat (NaJO ₃)
	50 g	Kalialaun
	50 g	Chloralhydrat
	1 g	Zitronensäure
<i>Eosin</i>	0,1 %	Eosin (Roth)
		Aqua dest.
	1 Tropfen	Essigsäure
<i>Normalserum (Chemicon, Temecula, CA; USA)</i>	150 µl	Pferdeserum
<i>Normalserum (Chemicon, Temecula, CA; USA)</i>	150 µl	Ziegenserum (SIGMA-ALDRICH, Sternheim, Deutschland)
<i>Sekundärantikörper (1:200) (Chemicon, Temecula, CA; USA)</i>	5 µl	Anti-Maus IgG
<i>Sekundärantikörper (1:200) (Chemicon, Temecula, CA; USA)</i>	5 µl	Anti-Kaninchen IgG

Tab 2. Puffer-, Farb- und Fixierungslösungen für die Immunhistochemie

3.2.3 Lichtmikroskopische und quantitative Auswertung

Die Güte der Perfusionsfixierung war an den freien Lumina der zerebralen Gefäße erkennbar. Die Auswertung der Befunde der histologischen Präparate erfolgte am Lichtmikroskop AXIOSKOP (Zeiss, Jena, Deutschland).

Der parasagittale Kortex in einer okzipitalen Ebene, der Hippokampus und das Striatum wurden auf neuronale Zellschäden untersucht, da dies Regionen sind, die vulnerabel gegenüber einer perinatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung sind (siehe 1.4.1). Aufgrund der ausgeprägten parasagittalen Kortexschädigung (> 50 %) im okzipitalen Neokortex wurde zum Vergleich der wenig vulnerable frontale Neokortex in die Analyse einbezogen.

Mögliche Veränderungen der ischämie – sensitiven Proteine MAP1B-, MAP2-, Synaptophysin-, GLUT1- und GLUT3-Immunreaktivität (IR) wurden innerhalb und außerhalb der zerebralen Schädigung analysiert. Die Identifizierung des geschädigten Gewebes erfolgte anhand der in der HE-Färbung sichtbaren neuronalen Zelluntergänge. Als geschädigt wurden Areale betrachtet, die mindestens 10 % nekrotische Zellen pro Gesichtsfeld in 3 verschiedenen Ausschnitten entsprechend den etablierten Kriterien der Neuropathologie aufwiesen. Nekrotische Neurone waren nach HE-Färbung durch ein stark eosinophiles Zytoplasma und ein dreiecksförmig ausgezogenes Perikaryon mit pyknotischen, chromatindichten Kernen zu erkennen (Towbin, 1998). Innerhalb der Regionen neuronaler Nekrosen im parasagittalen Kortex, Hippokampus und Striatum war der Verlust von MAP1B, MAP2, Synaptophysin und GLUT3 vollständig. Zur Messung der Immunmarkierung eigneten sich wenig nekrotisierte Gehirnregionen wie der frontale Neokortex, nekrosefreie Ausschnitte in Regionen der CA1- und CA3-Region des Hippokampus sowie des Striatums jedoch nicht in unmittelbarer Nachbarschaft des untergegangenen Gewebes (Penumbra) (entsprechend des Schafatlases von Johnson et al.). GLUT1 wies keinen Unterschied in der Expression zwischen nekrotischen und nekrosefreien Regionen auf. Eine Evaluation in den Nekrosegebieten wurde jedoch nicht als sinnvoll erachtet.

Zur morphometrischen Quantifizierung der Immunmarkierung wurde ein digitales Bildverarbeitungssystem (Scion Image 1.62a, NIH, USA) verwendet. Aus der zu beurteilenden Region wurden repräsentative Ausschnitte ausgewählt und mit Hilfe einer 3 CCD Farbvideocamera (MC3215, Sony) digitalisiert. Die Fläche der IR wurde für jeden Marker in drei verschiedenen Ausschnitten (20x1,6x10x0,6) innerhalb einer anatomischen Gehirnregion eines Tieres gemessen und die Werte gemittelt. Dabei wurden die Aufnahmen mittels eines Weißabgleiches standardisiert. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte im Schwarz-Weiß-Modus. Dazu wurde ein Schwellenwert für eine positive Immunmarkierung unter visueller Kontrolle mit dem originalen Präparat festgelegt. Um Signale zu vermeiden, die aus der Hämatoxylingegenfärbung resultieren, wurde ein Blaufilter eingesetzt. Diese Methode zur quantitativen Analyse der Immunreaktivität wurde mehrfach in der Literatur beschrieben, die mit Synaptophysin markierten präsynaptischen Endigungen (Leclerc et al., 1989; Mashliah et al., 1990) und die mit MAP1B und MAP2 immunpositiven Strukturen (Schwab et al., 2001, 2003, 2004; Antonow-Schlorke et al., 2000) konnten somit

quantifiziert werden. Die Auswertung von GLUT3 erfolgte in Analogie. Die Immunreaktivitäten von MAP1B, MAP2, Synaptophysin und dem Glukosetransportprotein GLUT3 veränderten sich nach Ischämie nur in der Verteilung, nicht aber in der Dichte der Markierung. Deshalb sind in vorliegender Arbeit lediglich die Flächen der Immunmarkierung aufgenommen worden. Für die Immunmarkierung von GLUT1 ist eine Aussage über die Messung der immunpositiven Fläche aus folgenden Gründen problematisch. Die Fläche der GLUT1-Immunreaktivität hängt ab von der Proteinexpression, zudem jedoch in starkem Maße von den im Bildausschnitt vorhandenen Gefäßlumina. Diese sind abhängig von der Gefäßgröße und dem Grad der Vaskularisierung des Gewebes. Dagegen ist die Dichte der GLUT1-Immunreaktivität unabhängig von der immunpositiven Fläche und ist daher ein geeigneter Parameter, um eine eventuelle Veränderung der GLUT1-Proteinexpression in den Mikrogefäßen zu erfassen. Die quantitative Analyse mittels der optischen Dichte der GLUT1 – IR in den Endothelzellen der BHS wurde als Methode detailliert beschrieben (Gschanes et al., 2000) und in der Literatur ebenfalls anerkannt.

3.2.4 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) dargestellt. Aufgrund der unbekannten Verteilung wurden die histologischen Daten mittels eines nichtparametrischen Tests für unabhängige Stichproben nach Kruskal-Wallis und eines posthoc Tests getestet. Der Vergleich der Blutgase, Glukose- und Laktatwerte zwischen den scheinoperierten Feten, der Kontrollgruppe und den mit Betamethason behandelten Feten zu den jeweiligen Zeitpunkten erfolgte mittels one way ANOVA und dem Student-Newman-Keul posthoc Test. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als Signifikanzniveau festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Physiologische Parameter

Während des Beobachtungszeitraumes befanden sich alle untersuchten Tiere in einem guten Allgemeinzustand. Weder klinisch noch elektromyographisch konnten Zeichen der Einleitung einer spontanen Geburt nachgewiesen werden. Hinsichtlich des fetalen Gewichtes waren zum Zeitpunkt der Sektion keine signifikanten Unterschiede zwischen den scheinoperierten Feten $3,3 \pm 0,21$ kg, den Kontrolltieren $3,1 \pm 0,26$ kg und den mit Betamethason behandelten Feten $2,6 \pm 0,25$ kg festzustellen.

Die fetalen Blutgase der scheinoperierten Gruppe lagen zu jedem Zeitpunkt des Experimentes innerhalb der physiologischen Normbereiche (Abb.3).

Die Blutgase der Kontrolltiere waren vor und zu Beginn der Infusion ebenfalls im physiologischen Normbereich. Die Parameter folgten während der Nabelschnurokklusionen in typischer Weise den beschriebenen Veränderungen bei schwerer Hypoxie, d.h. ein Abfall des arteriellen pH-Wertes auf 6,9 – 7,2 und der Sauerstoffsättigung unter 20 - 25%, während der Kohlendioxidpartialdruck und das Laktat anstiegen ($p < 0,01$; Abb.3 gemittelt über 4 Nabelschnurokklusionen, Tab. 3 für jede Nabelschnurokklusion extra). Der arterielle pH-Wert sank im Vergleich zu den Ausgangswerten von $7,34 \pm 0,01$ auf $7,13 \pm 0,04$ (über die 4 Nabelschnurokklusionen gemittelt), der Sauerstoffpartialdruck von $21,6 \pm 2,0$ auf $10,26 \pm 1,2$ mmHg und die Sauerstoffsättigung von $48,1 \pm 5,3$ auf $12,9 \pm 3,2$ %. Der Kohlendioxidpartialdruck stieg während der Nabelschnurokklusionen von Ausgangswerten von $49,0 \pm 1,5$ auf $71,0 \pm 2,9$ mmHg. Zwei Stunden nach der letzten Nabelschnurokklusion kehrten die Blutgaswerte auf ihre Ausgangswerte zurück (Abb.3). Die Glukosewerte waren während des gesamten Untersuchungszeitraumes nahezu konstant (Abb.3). Die während der Nabelschnurokklusionen von $1,3 \pm 0,2$ auf $5,3 \pm 0,8$ mmol/l angestiegenen Laktatwerte ($p < 0,05$) erreichten in der Kontrollgruppe 2 h nach der letzten Nabelschnurokklusion ihre Ausgangswerte (Abb. 3).

Die Gabe von Betamethason bewirkte keine Veränderungen der Blutgase vor, während und nach jeder Nabelschnurokklusion im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die Glukosewerte zeigten sich unter der Gabe von Betamethason 2 h vor und 2 bzw.

24 h nach den Nabelschnurokklusionen im Vergleich zu den Ausgangswerten und 2 h vor bzw. 2 h nach den Nabelschnurokklusionen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht ($p < 0,05$). Auch die Laktatwerte waren unter der Gabe von Betamethason 2 h vor den Nabelschnurokklusionen tendenziell erhöht und während und 2 h später sowohl gegenüber ihren Ausgangswerten als auch im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht $p < 0,05$ (Abb. 3).

Betrachtet man die vier Nabelschnurokklusionen einzeln, ließ sich jeweils während der Nabelschnurokklusionen ein Abfall des pH-Wertes ($p < 0,01$), der arteriellen Sauerstoffsättigung ($p < 0,01$) und des Sauerstoffpartialdruckes ($p < 0,05$) sowie ein Anstieg des Kohlendioxidpartialdruckes ($p < 0,01$) beobachten. Die ähnlichen hypoxischen Änderungen der Blutgase während der 4 Nabelschnurokklusionen zeigten, dass die Asphyxie in der Kontrollgruppe und in der Gruppe der mit Betamethason behandelten Feten ähnlich ausgeprägt war (Tab.1).

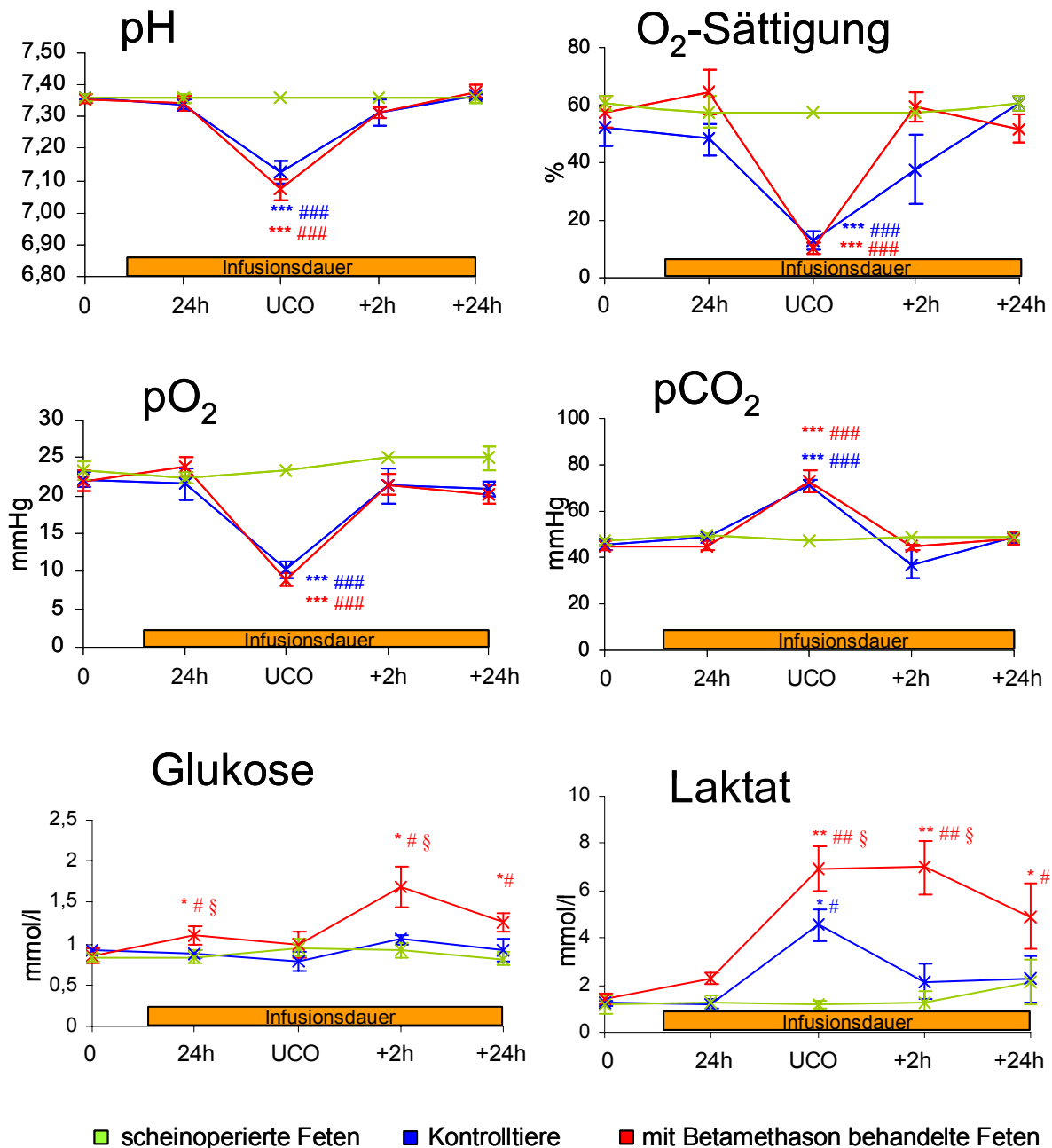


Abb.3 (nächste Seite) Blutgase, Glukose- und Laktatwerte während des experimentellen Protokolls (Die Infusionsdauer ist orange unterlegt):

0 · vor der NaCl- und Betamethasoninfusion

24h · zu Beginn der NaCl- und Betamethasoninfusion

UCO · Mittelwert der Blutgaswerte während der 4 Nabelschnurokklusionen (UCO) bestimmt jeweils in der 3. Minute der 4 Minuten dauernden Nabelschnurokklusion

+2h · 2 h nach Nabelschnurokklusion

+24 h · 24 h nach Nabelschnurokklusion

Die Gabe von Betamethason führte 2 h bzw. 2 h nach den Nabelschnurokklusionen zu einem Anstieg der Glukosewerte und zu einem Anstieg der Laktatwerte während den Nabelschnurokklusionen, welche noch 2 h später signifikant erhöht waren.

MW±SEM; n=7 in allen Gruppen, *** p<0,001, ** p<0,01, * p<0,05 scheinoperierte Feten vs. Kontrolltiere bzw. mit Betamethason behandelte Feten; ### p<0,001, ## p<0,01 # p<0,05 im Vergleich zu den Ausgangswerten; §§ p<0,01, § p<0,05 Kontrolltiere vs. mit Betamethason behandelte Feten

Nabelschnurokklusion

	pH	pCO ₂ [mmHg]	pO ₂ [mmHg]	sO ₂ [%]
<i>vor UCO1</i>	7,34±0,01	44,0±1,8	21,0±1,7	64±3
UCO1	7,18±0,04**	63,5±4,8**	10,9±1,2**	20±6**
<i>vor UCO2</i>	7,28±0,02	46,3±2,5	21,1±2,2	52±5
UCO2	7,15±0,05**	68,8±6,7**	12,0±1,7**	18±5**
<i>vor UCO3</i>	7,31±0,02	43,4±1,7	21,8±1,8	59±4
UCO3	7,17±0,05**	67,1±7,3**	11,5±1,6**	21±6**
<i>vor UCO4</i>	7,29±0,02	46,4±2,0	23,7±2,2	60±3
UCO4	7,16±0,04**	62,9±4,2**	10,4±1,3**	17±4**

Nabelschnurokklusion mit Betamethasongabe

	pH	pCO ₂ [mmHg]	pO ₂ [mmHg]	sO ₂ [%]
<i>vor UCO1</i>	7,34±0,01	45,8±1,7	20,6±1,1	58±6
UCO1	7,18±0,04**	61,5±7,4**	10,9±2,3**	17±6**
<i>vor UCO2</i>	7,26±0,02	45,3±1,6	22,3±1,8	55±7
UCO2	7,11±0,04**	73,2±6,4**	10,2±2,2**	21±8**
<i>vor UCO3</i>	7,21±0,03	44,9±1,3	23,4±1,7	56±6
UCO3	7,05±0,05**	68,3±5,3**	9,1±1,1**	11±3**
<i>vor UCO4</i>	7,18±0,03	47,8±4,1	23,8±2,4	54±7
UCO4	7,10±0,04**	65,9±5,8**	14,1±3,1*	17±5**

Tab.3 Blutgase, Glukose und Laktat vor und während der einzelnen Nabelschnurokklusionen (UCO).

Vor UCO 5 Minuten vor Beginn der nächsten UCO

UCO bestimmt jeweils in der 3. Minute der 4 Minuten dauernden Nabelschnurokklusion

Die ähnlichen hypoxischen Änderungen der Blutgase in der Kontrollgruppe und in der Gruppe der mit Betamethason behandelten Feten während der 4 Nabelschnurokklusionen zeigten, dass die Asphyxie ähnlich ausgeprägt war.

MW±SEM; n=7 in allen Gruppen; ** p<0,01, * p<0,05 jeweils im Vergleich zu vor der Nabelschnurokklusion (UCO)

4.2 Zerebrale Schädigungsmuster nach einer intrauterinen Asphyxie und die Effekte von Betamethason

Das Ausmaß des neuronalen Zelluntergangs wurde nach der Übersichtsfärbung mit HE beurteilt.

Mit den durchgeführten Nabelschnurokklusionen ließ sich im fetalen Schafsgehirn das für eine perinatale Hypoxie nach der 32. SSW auch im menschlichen Feten typische Muster einer zerebralen Hirnschädigung mit neuronalen Nekrosen primär im Bereich des parasagittalen Kortex und des Hippokampus reproduzieren (siehe 2.4.1, Abb.4 und 6).

4.2.1 Neokortex

Okzipitaler Neokortex

Auch die scheinoperierten Tiere wiesen neuronale Zelluntergänge im okzipital untersuchten parasagittalen Kortex auf. Diese entsprachen jedoch einem neuronalen Zellverlust von weniger als 30 %.

Eine 4 x 4 minütige Nabelschnurokklusion führte zu flächigen neuronalen Nekrosen entsprechend dem Muster einer parasagittalen Kortexschädigung (Abb. 4). Diese wurde durch die Gabe von Betamethason deutlich auf die lateralen kortikalen Bezirke ausgedehnt (Abb. 4 und 5, $p < 0,05$). Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, lag das Ausmaß des neuronalen Zellverlustes bei über 50 % bis hin zu einem nahezu vollständigen Gewebsverlust, begleitet von einer starken Ödematisierung des Gewebes.

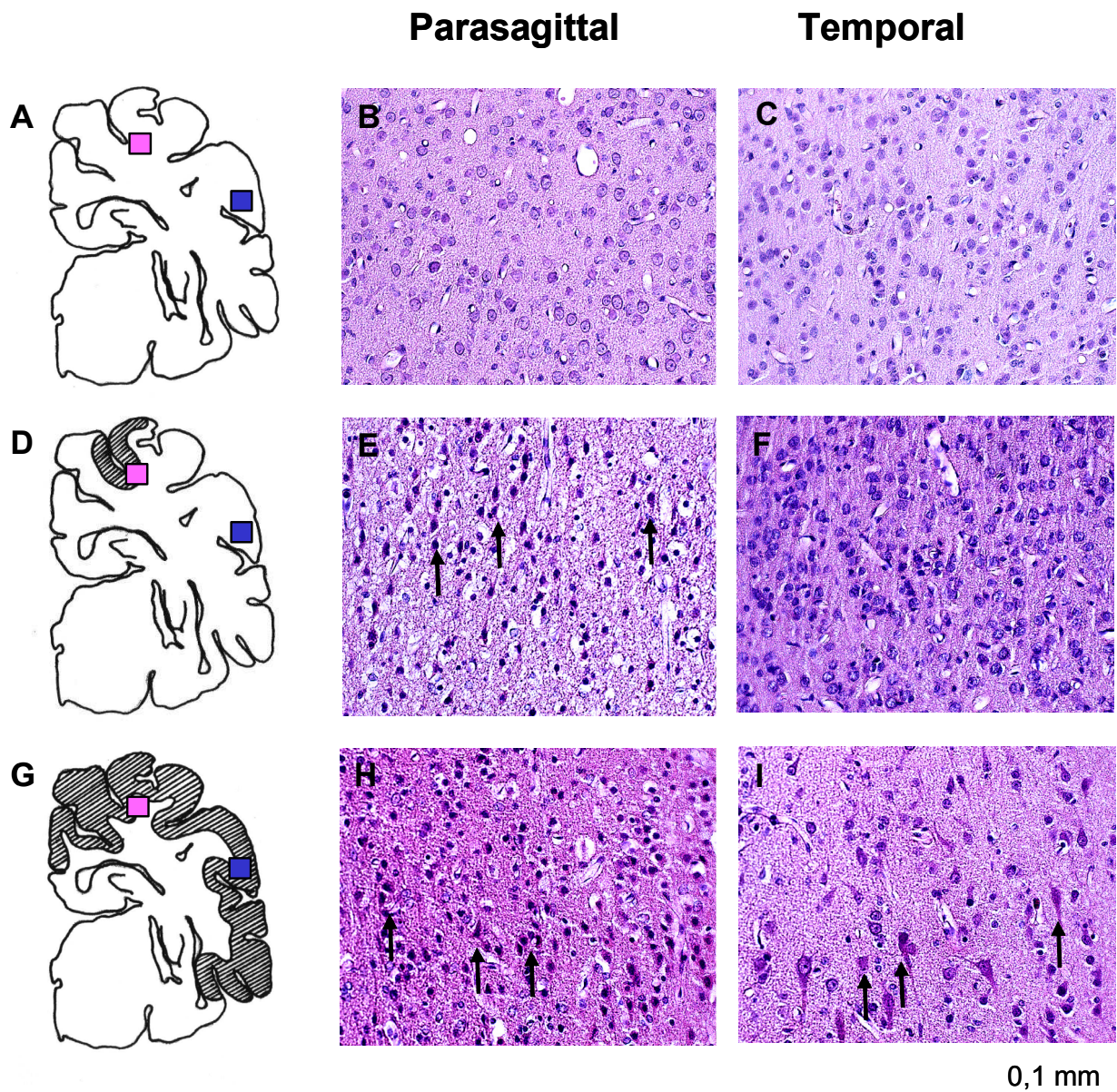


Abb. 4 Schädigungsmuster im okzipitalen Neokortex nach fetaler Asphyxie durch eine 4 x 4 minütige Nabelschnurokklusion am Schaffeten (0,84 der Gestationsdauer). Die Nabelschnurokklusion führte zu einer parasagittalen Kortexschädigung (D), welche durch die Gabe von Betamethason deutlich ausgedehnt wurde (G). Die nekrotischen Gehirnareale wurden in der schematischen Darstellung schraffiert (A,D,G).

A-C_ scheinoperierte Feten

D-F_ Kontrolltiere

G-I_ mit Betamethason behandelte Feten

Aus den farbig markierten Bezirken stammen die Bildausschnitte (vorwiegend mittlere Schichten des kortikalen Zellbandes, Hämatoxylin-Eosin) im rechten Teil der Abbildung. Violett_ parasagittaler Kortex (B,E,H); Blau_ Temporaler Kortex (C,E,F). Nekrotische Zellen sind durch Eosinophilie des Zytoplasmas und einen pyknotischen Nukleus gekennzeichnet und durch Pfeile hervorgehoben.

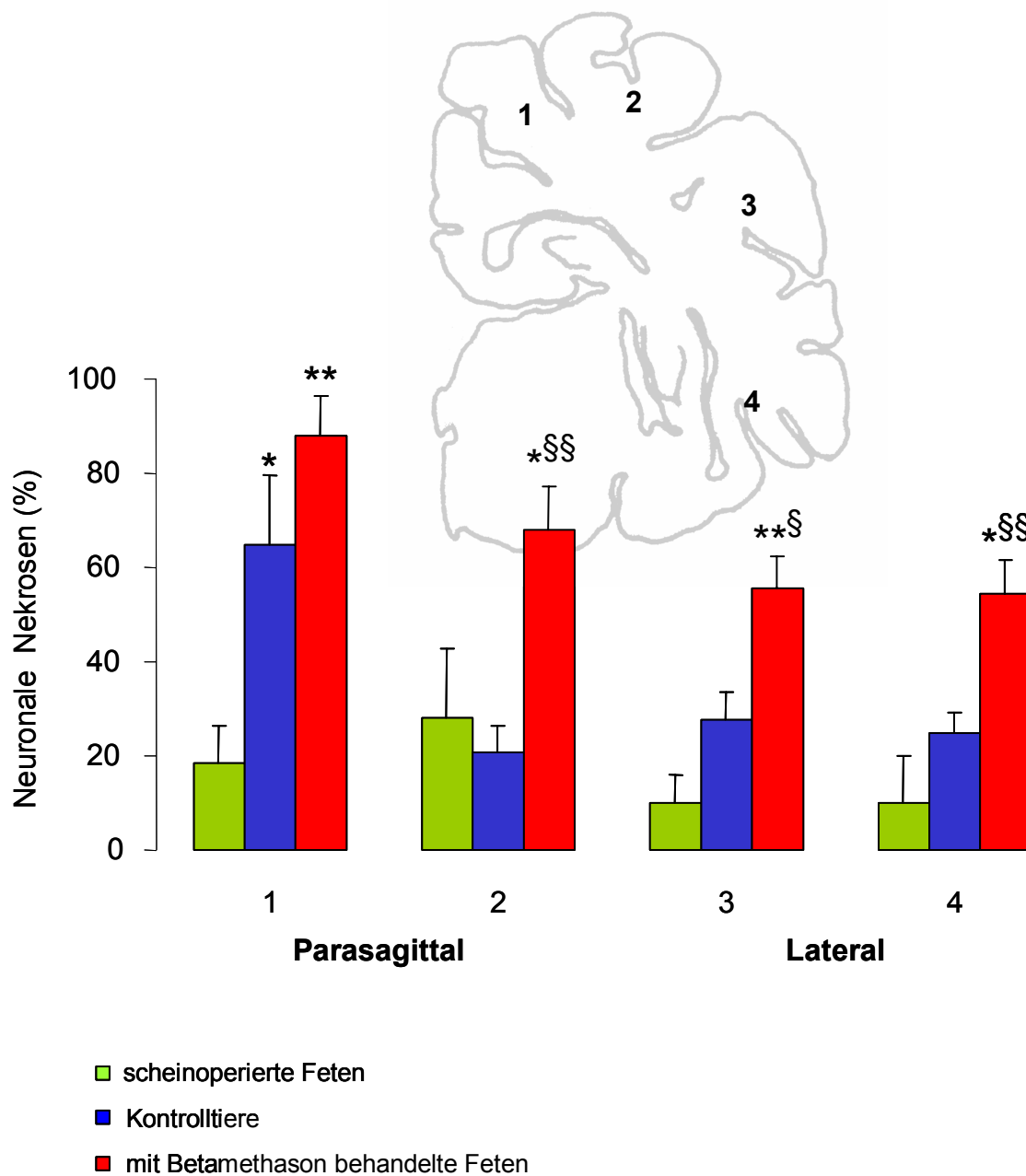


Abb.5 Verteilung der neuronalen Nekrosen im okzipitalen Neokortex nach einer 4 x 4 minütige Nabelschnurokklusion am Schaffeten (0,84 der Gestationsdauer). Das typische Muster einer parasagittalen Kortexschädigung wird durch die Gabe von Betamethason bis hin zu den lateral kortikalen Bezirken ausgedehnt.

MW±SEM; n=7 * p<0,05, ** p<0,01 scheinoperierte Feten vs. Kontrolltiere bzw. mit Betamethason behandelte Feten; § p<0,05, §§ p<0,01 Kontrolltiere vs. mit Betamethason behandelte Feten

Frontaler Neokortex

Der zum Vergleich herangezogene frontale Neokortex war auch parasagittal von Nekrosen vergleichsweise wenig betroffen. Bei den scheinoperierten Feten zeigten sich sowohl parasagittal als auch lateral vereinzelt selektive Zelluntergänge bis zu 10 % (Abb. 6). Nach den Nabelschnurokklusionen war sowohl unter NaCl- als auch Betamethasongabe keine Zunahme neuronaler Zelluntergänge zu verzeichnen (Abb. 6).

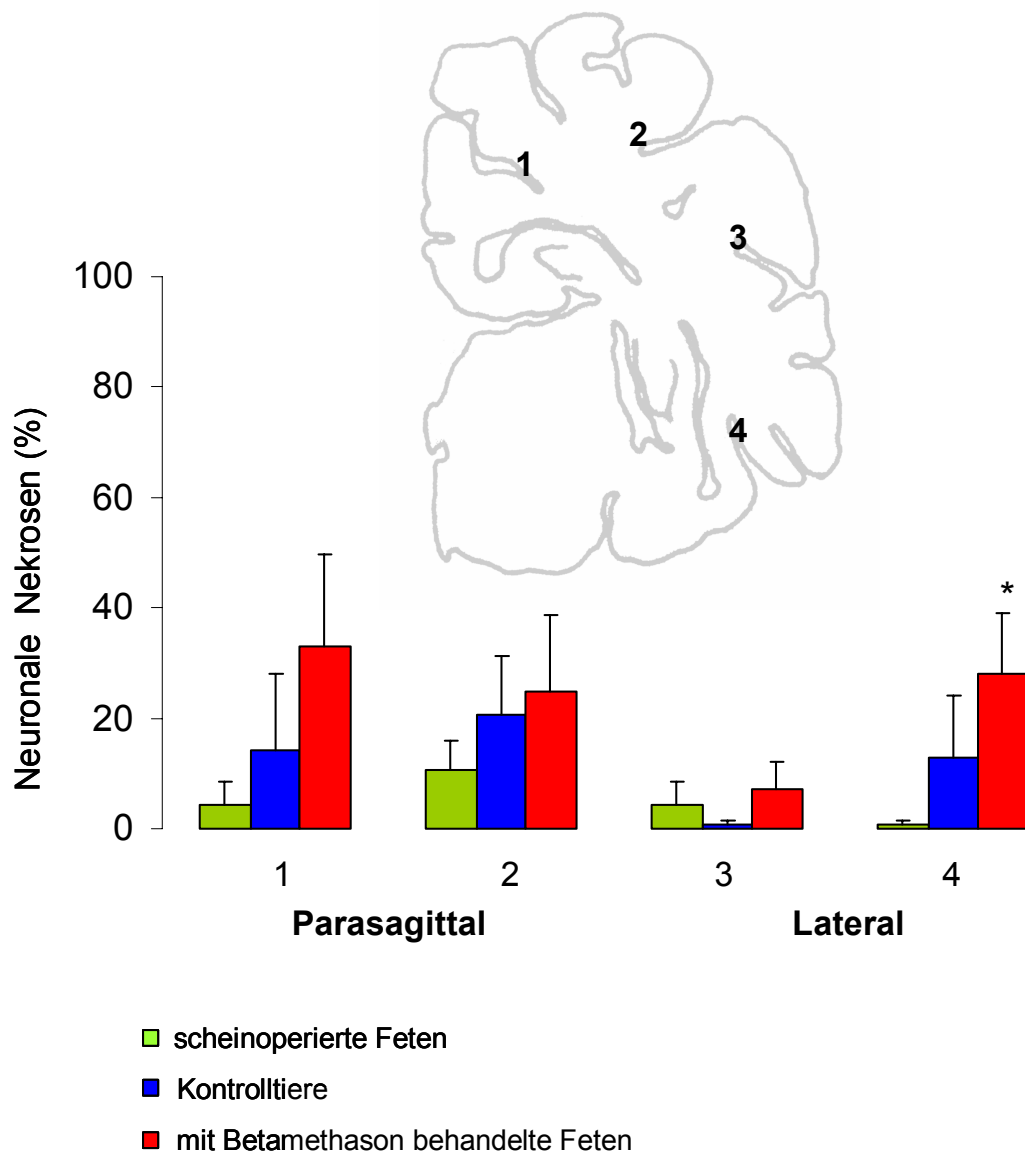


Abb.6 Verteilung der neuronalen Zelluntergänge im frontalen Neokortex nach einer 4 x 4 minütige Nabelschnurokklusion am Schaffeten (0,84 der Gestationsdauer). Es zeigten sich vereinzelt selektive neuronale Zelluntergänge, welche durch die Gabe von Betamethason unverändert blieben.

MW±SEM; n=7; * p<0,05, scheinoperierte Feten vs. mit Betamethason behandelte Feten

4.2.2 Hippokampus

Bei den scheinoperierten Feten wurden in der CA1- und CA3-Region des Hippokampus nur vereinzelt Pyramidenzelluntergänge ($< 10\%$) gefunden.

Nach den Nabelschnurokklusionen waren $18,93 \pm 3,4\%$ der hippokampalen Pyramidenzellen nekrotisch (Abb. 7, 8). Unter der Gabe von Betamethason zeigte sich in der CA1-Region eine Tendenz zur Steigerung des Anteils nekrotischer Zellen von $20,45 \pm 4,3\%$ auf $34,19 \pm 13,3\%$. In der CA3-Region war diese Steigerung von $17,4 \pm 2,6\%$ auf $43,1 \pm 9,6\%$ signifikant gegenüber den Kontrolltieren ($p < 0,05$; Abb. 7, 8).

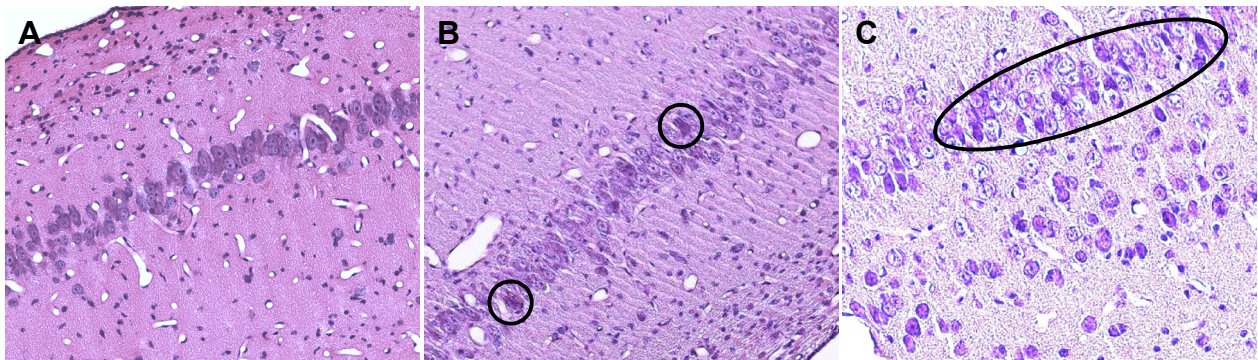


Abb.7 Neuronale Nekrosen in der CA1-Region des Hippokampus (Hämatoxylin-Eosin) nach Asphyxie am Schaffeten.

Im Bereich der Markierungen zeigten sich selektive neuronale Zelluntergänge (trianguläre Zellform, stark violette Anfärbung), die unter der Gabe von Betamethason deutlich ausgeprägter waren.

A_ scheinoperierte Feten

B_ Kontrolltiere

C_ mit Betamethason behandelte Feten

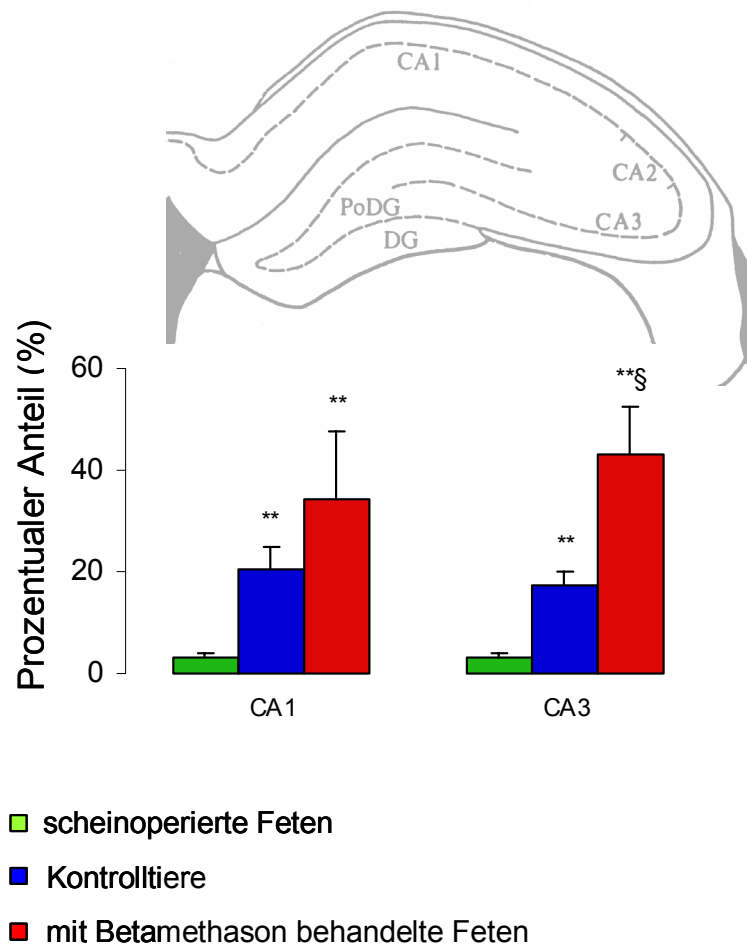


Abb.8 Neuronale Nekrosen der hippocampalen Regionen CA1 und CA3 nach 4 x 4 minütiger Nabelschnurokklusion am fetalen Schaf. Die Nabelschnurokklusion führte zu einer hippocampalen Schädigung mit selektiven neuronalen Nekrosen, welche durch die Gabe von Betamethason in der CA3-Region signifikant erhöht war. MW±SEM; n=7 * p<0,05, ** p<0,01 scheinoperierte Feten vs. Kontrolltiere bzw. mit Betamethason behandelte Feten; § p<0,05, §§ p<0,01 Kontrolltiere vs. mit Betamethason behandelte Feten

4.2.3 Striatum

Im Striatum als nichtkortikale Gehirnregion zeigten sich vergleichsweise wenig neuronale Zelluntergänge (< 10 %) bei den scheinoperierten Tieren.

24h nach den Nabelschnurokklusionen waren selektiv neuronale Zelluntergänge (< 30%, $p < 0,01$) zu finden, welche durch die Gabe von Betamethason nicht verändert wurden (Abb. 9).

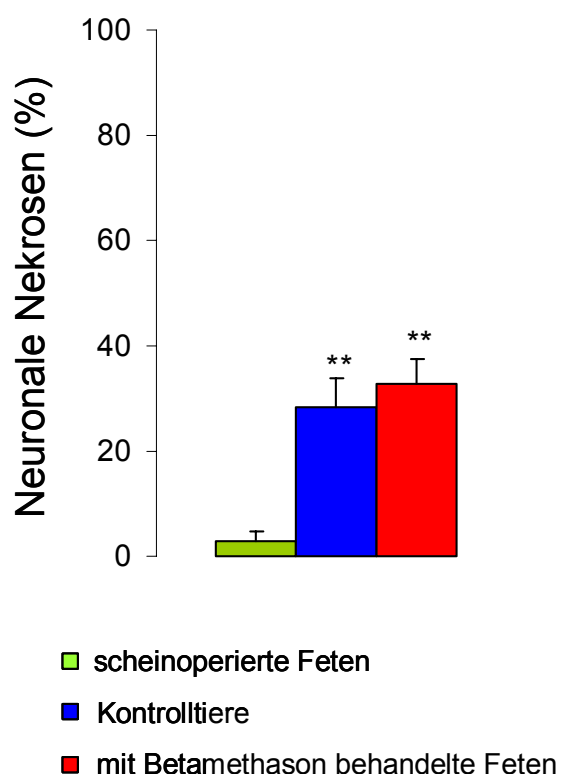


Abb.9 Neuronale Zelluntergänge im Striatum nach einer 4 x 4 minütiger Nabelschnurokklusion am fetalen Schaf. Die Nabelschnurokklusion führte zu selektiven neuronalen Zelluntergängen im Striatum. Die Gabe von Betamethason hatte keinen Effekt auf die neuronale Schädigung.

MW \pm SEM; n=7 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ scheinoperierte Feten vs. Kontrolltiere bzw. mit Betamethason behandelte Feten; § $p < 0,05$, §§ $p < 0,01$ Kontrolltiere vs. mit Betamethason behandelte Feten

4.3 Morphologische Effekte einer intrauterinen Asphyxie auf ausgewählte Proteine und die Effekte von Betamethason

4.3.1 Neuronale Zytoskelettproteine MAP1B und MAP2

Im Gehirnparenchym fetaler Schafe konnten MAP1B und MAP2 am 127. dGA (0,84 der Gestationsdauer) immunhistochemisch in den neuronalen Perikarya und in ihren Fortsätzen nachgewiesen werden. Da MAP1B und MAP2, gleiches gilt für Synaptophysin und GLUT3, in den Regionen mit selektiven Nekrosen nicht mehr nachweisbar waren, wurden zur Messung der Immunmarkierung wenig nekrotisierte Gehirnregionen wie der frontale Neokortex und die Regionen des Hippokampus sowie des Striatum ohne neuronale Nekrosen herangezogen.

MAP1B

24h nach fetaler Asphyxie zeigte sich in allen untersuchten Gehirnregionen der Kontrolltiere ein deutlicher Verlust der MAP1B-IR. Die gegenüber einer Asphyxie vulnerablen Regionen (parasagittaler Kortex und Hippokampus) waren von einem nahezu vollständigen MAP-Verlust begleitet. In den nekrosefreien Regionen wurde dagegen ein partieller Verlust der IR gefunden. Der Verlust von der MAP1B-IR nach Nabelschnurokklusion in den nekrosefreien Regionen entsprach $56,3 \pm 2,4$ % im frontalen Neokortex, $70,6 \pm 2,6$ % im Striatum, $69,6 \pm 3,8$ % in der CA1-Regionen und $61,8 \pm 7,0$ % in der CA3-Region des Hippokampus gegenüber den scheinoperierten Feten ($p < 0,01$; Abb.11).

Der MAP1B-Verlust betrug unter Betamethason $52,1 \pm 4,1$ % im frontalen Neokortex, $70,1 \pm 4,1$ % im Striatum und $44,5 \pm 4,1$ % in der CA1-Region und $35,1 \pm 9,6$ % in der CA3-Region des Hippokampus ($p < 0,05$, Abb. 10 und 11). Damit zeigte sich der MAP1B-IR Verlust im Vergleich zu den Kontrolltieren in der hippokampalen CA1- um $45,3 \pm 6,8$ % und CA3-Region um $41,1 \pm 8,3$ % vermindert ($p < 0,05$). Betamethason bewirkte keine Änderung der IR von MAP1B im frontalen Neokortex sowie im Striatum.

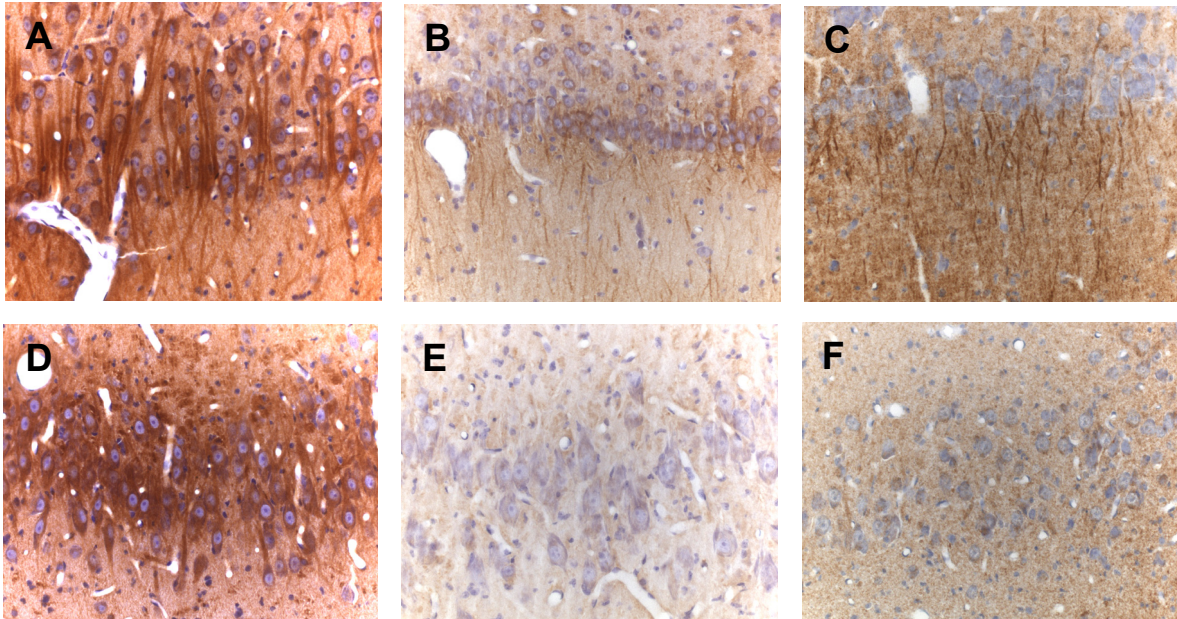


Abb.10 Immunmarkierung von MAP1B (braunes Präzipitat in den neuronalen Perikarya und Fortsätzen bei Hämatoxylingegenfärbung zur Visualisierung der Nuklei) in der CA1- (oben) und der CA3- (unten) Region des Hippokampus ohne neuronale Nekrosen. Die Nabelschnurokklusionen führten zu einem Verlust der MAP1B-IR (B,E), welcher durch die Gabe von Betamethason vermindert war (C,F).
A,D_ scheinooperierte Feten
B,E_ Kontrolltiere
C,F_ mit Betamethason behandelte Tiere

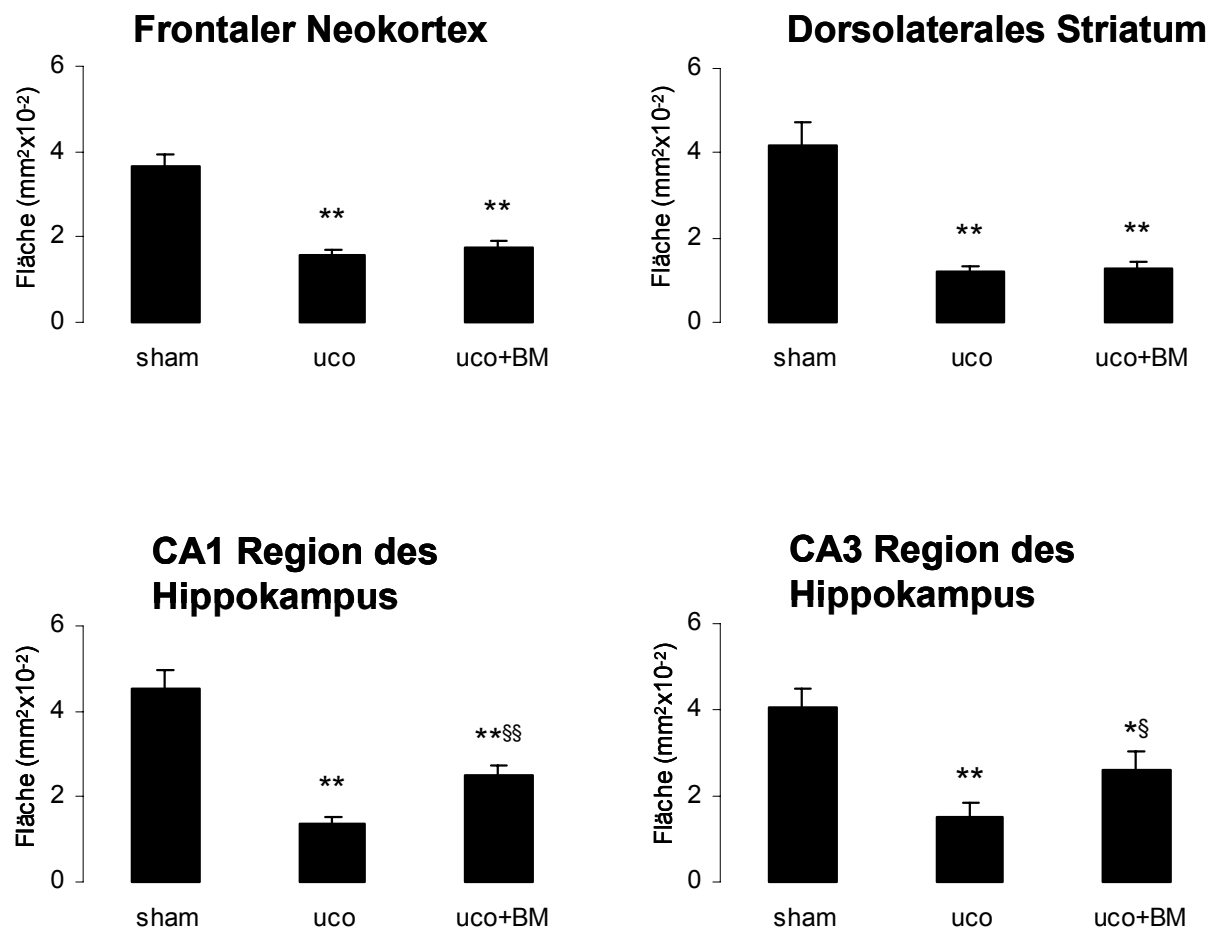


Abb.11 Abnahme der MAP1B-Immunreaktivität (IR) 24 h nach einer repetitiven Nabelschnurokklusion (4 x 4 min im Abstand von 30 min). Der Verlust der Immunmarkierung nach Asphyxie wurde durch Betamethason (BM) vermindert. MW+SEM; sham_scheinoperierte Feten (n=7); uco_Kontrolltiere (n=7); uco+BM_mit Betamethason behandelte Feten (n=7); * p<0,05; ** p<0,01 scheinoperierte Feten vs. Kontrollgruppe; § p<0,05 Kontrolltiere vs. mit Betamethason behandelte Feten

MAP2

Der Verlust der MAP2-IR war in den Regionen neuronaler Nekrosen des parasagittalen Kortex und des Hippokampus ebenfalls vollständig.

In den nekrosefreien Gehirnregionen ergab sich ein Abfall der Immunmarkierung nach den Nabelschnurokklusionen im frontalen Neokortex um $40,8 \pm 5,4$ %, im Striatum um $54,2 \pm 2,9$ %, in der CA1- und der CA3-Region des Hippokampus um

58,7 ± 3,8 % und 60,5 ± 5,6 % gegenüber den scheinoperierten Feten ($p < 0,05$; Abb.12, 13).

Der MAP2-Verlust betrug unter Betamethason 23,6 ± 3,7 % im frontalen Neokortex, 34,6 ± 5,8 % im Striatum und 2,9 ± 8,9 % in der CA1-Region und 47,9 ± 6,4 % in der CA3-Region des Hippokampus ($p < 0,05$; Abb.12, 13). Damit war der Verlust für die MAP2-IR nach der Gabe von Betamethason im Vergleich zu den Kontrolltieren im frontalen Neokortex um 22,6 ± 7,1 %, im Striatum um 30,0 ± 4,4 % und in der CA3-Region des Hippokampus um 24,3 ± 10,8 % vermindert ($p < 0,05$, Abb. 12,13). Betamethason hatte keinen Effekt auf die MAP2-IR in der CA1-Region des Hippokampus (Abb. 13).

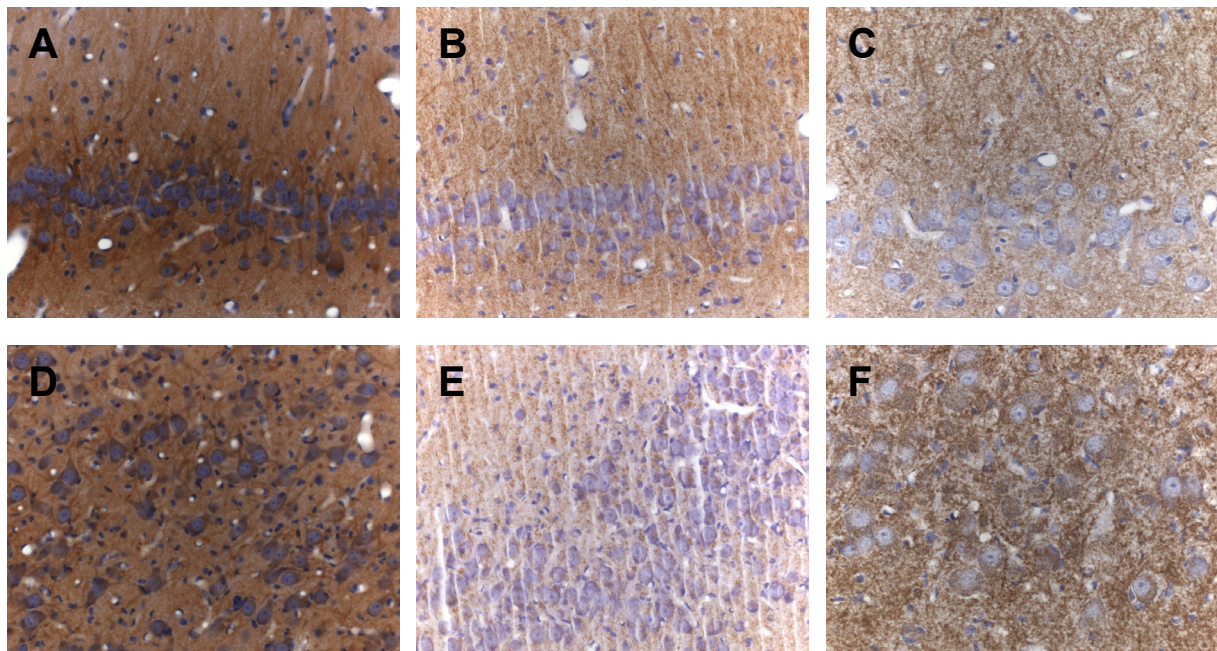


Abb.12 Immunmarkierung von MAP2 (braunes Präzipitat in den neuronalen Perikarya und Fortsätzen bei Hämatoxylingegenfärbung zur Visualisierung der Nuklei) in der CA1- (oben) und der CA3- (unten) Region des Hippokampus ohne neuronale Nekrosen. Die Nabelschnurokklusionen führten zu einem Verlust der MAP2-IR (B,E), welcher durch die Gabe von Betamethason in der CA3-Region vermindert und in der CA1-Region unverändert war (C,F).

A,D_ scheinoperierte Feten

B,E_ Kontrolltiere

C,F_ mit Betamethason behandelte Tiere

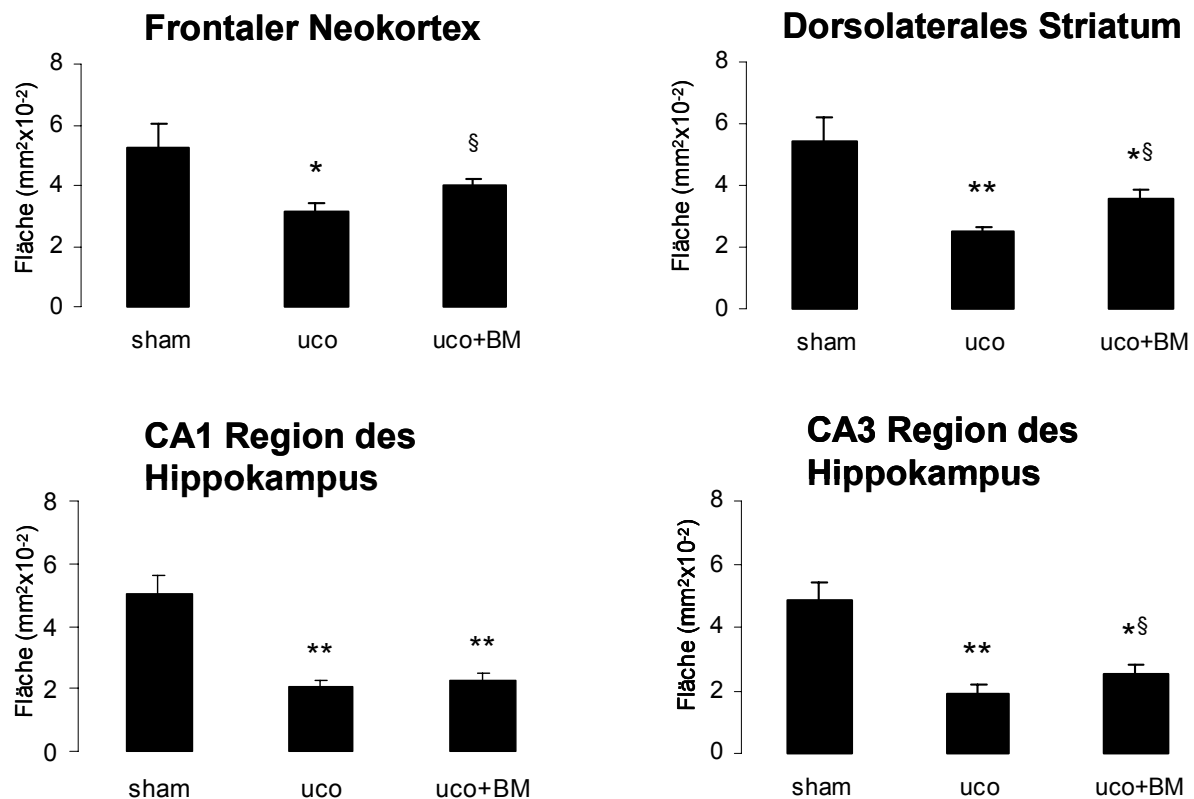


Abb.13 Verlust der MAP2-Immunreaktivität (IR) 24 h nach einer repetitiven Nabelschnurokklusion (4 x 4 min im Abstand von 30 min). Der Verlust der Immunmarkierung nach Asphyxie war bis auf die CA1-Region durch Betamethason vermindert.

MW+SEM; sham_scheinoperierte Feten (n=7); uco_Kontrolltiere (n=7); uco+BM_mit Betamethason behandelte Feten (n=7);

* p<0,05; ** p<0,01 scheinoperierte Feten vs. Kontrollgruppe/ mit Betamethason behandelte Feten ; § p<0,05 Kontrolltiere vs. mit Betamethason behandelte Feten

4.3.2 Synaptophysin

Die immunhistochemische Verteilung von Synaptophysin im Neuropil entspricht dem Vorkommen des Proteins in der neuronalen Zellmembran. Die Synaptophysin-IR stellte sich bei den scheinoperierten Feten in Form eines diffusen, braun erscheinenden, granulären Markierungsmusters im Neuropil und in den Bereichen der neuronalen Fortsätze dar.

Nach fetaler Asphyxie zeigte sich ein Verlust der Synaptophysin-IR, welcher in Regionen neuronaler Nekrosen (parasagittaler Kortex und Hippokampus) vollständig war. In den nekrosefreien Gehirnregionen betrug dieser Verlust $51,5 \pm 6,8$ % im frontalen Neokortex, $61,5 \pm 3,3$ % im Striatum, $80,5 \pm 2,5$ % in der CA1-Region und

68,2 ± 6,46 % in der CA3-Region des Hippokampus gegenüber den scheinoperierten Feten ($p < 0,01$, Abb. 14 und 15).

Der Synaptophysin-Verlust betrug unter Betamethason 55,3 ± 9,0 % im frontalen Neokortex, 65,2 ± 4,9 % im Striatum und 76,8 ± 4,3 % in der CA1-Region und 57,9 ± 9,6 % in der CA3-Region des Hippokampus ($p < 0,01$, Abb. 14 und 15). Die Gabe von Betamethason bewirkte damit keine Veränderung der IR für Synaptophysin in den untersuchten Gehirnregionen.

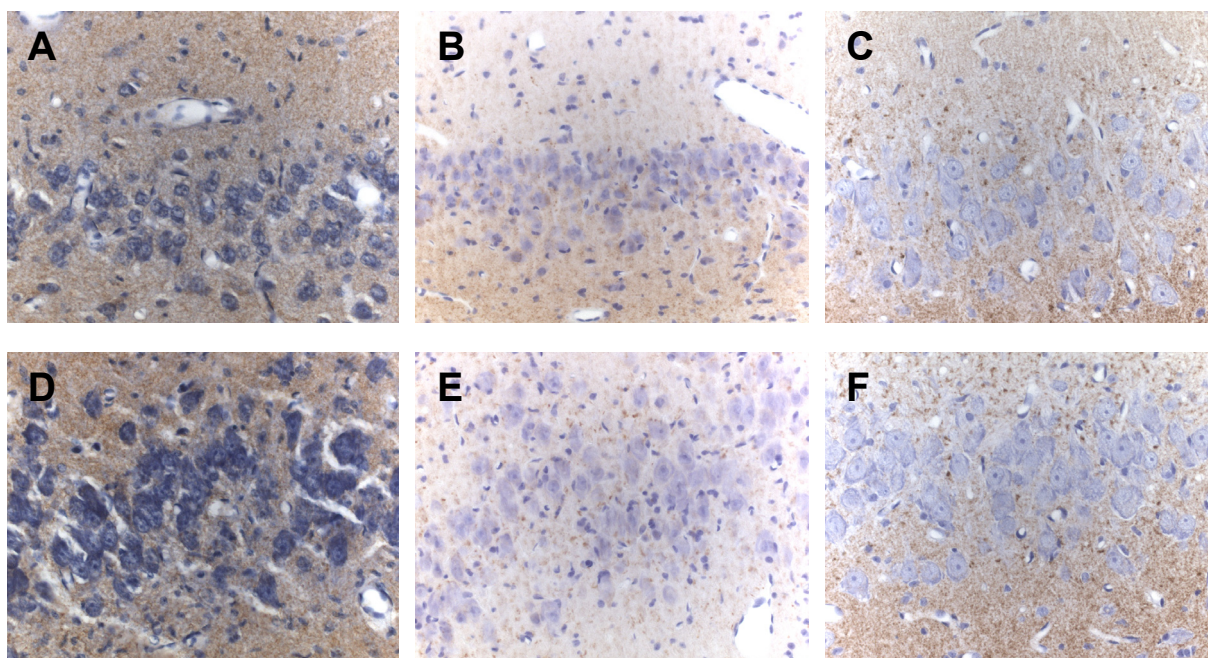


Abb.14 Immunmarkierung von Synaptophysin (braunes Präzipitat bei Hämatoxylingegenfärbung zur Visualisierung der Nuklei) in der CA1- (oben) und der CA3- (unten) Region des Hippokampus ohne neuronale Nekrosen. Die Nabelschnurokklusionen führten zu einem Verlust der Synaptophysin-IR (B,E), welcher durch die Gabe von Betamethason unverändert war (C,F).

A,D_ scheinoperierte Feten

B,E_ Kontrolltiere

C,F_ mit Betamethason behandelte Tiere

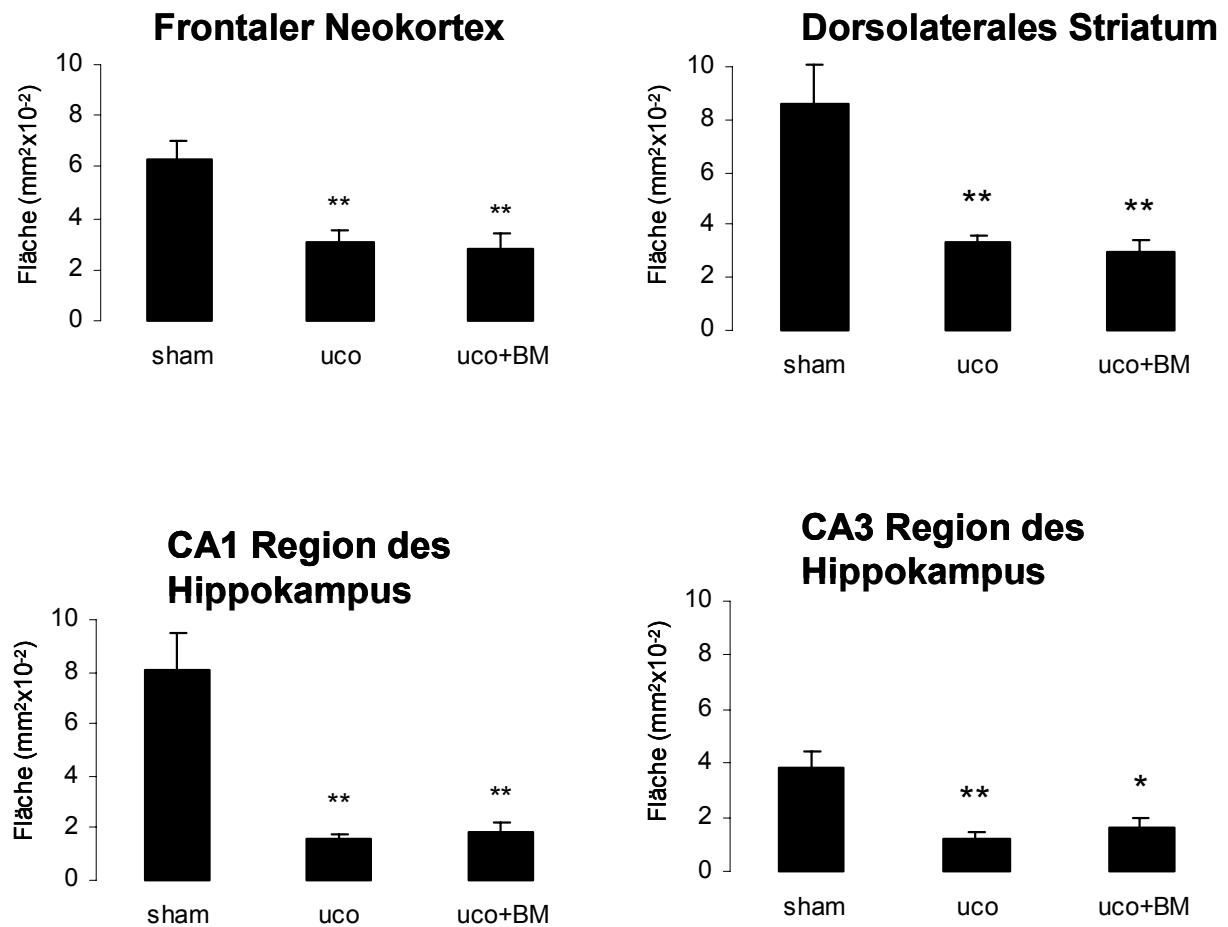


Abb.15 Verlust der Synaptophysin-Immunreaktivität (IR) 24 h nach einer repetitiven Nabelschnurokklusion (4 x 4 min im Abstand von 30 min). Der Abfall der IR nach Asphyxie blieb durch die Gabe von Betamethason unverändert.

MW+SEM; sham_scheinoperierte Feten (n=7); uco_Kontrolltiere (n=7); uco+BM_mit Betamethason behandelte Feten (n=7);

* p<0,05; ** p<0,01 scheinoperierte Feten vs. Kontrollgruppe/ mit Betamethason behandelte Feten ; § p<0,05 Kontrolltiere vs. mit Betamethason behandelte Feten

4.3.3 Glukosetransportproteine GLUT1 und GLUT3

GLUT1 kommt selektiv in den Endothelien der zerebralen Mikrogefäße des fetalen Schafes vor. In den nekrotischen Regionen des parasagittalen Kortex und des Hippokampus zeigten die Messungen der GLUT1-IR keinen Unterschied zu den Messungen in den nekrosefreien Regionen des frontalen Neokortex, des Striatum und des Hippokampus. Da in den nekrotischen Regionen eine Messung der GLUT1 IR als nicht sinnvoll erachtet wurde, erfolgte die Angabe der Anstiege von der GLUT1 – IR nur in den nekrosefreien Regionen.

Die repetitive Nabelschnurokklusion resultierte nach 24 h in einem Anstieg der GLUT1-IR in allen untersuchten nekrosefreien Hirnregionen ($p < 0,05$, Abb.17). Die GLUT1-IR stieg um $4,8 \pm 0,4$ % im frontalen Neokortex, um $2,6 \pm 0,3$ % im Striatum, um $4,8 \pm 1,2$ % und $4,9 \pm 1,0$ % in den CA1- und CA3-Regionen des Hippokampus ($p < 0,05$, Abb. 16 und 17).

Der Anstieg von GLUT1 unter Betamethason betrug $10,5 \pm 2,1$ % im frontalen Neokortex, $7,4 \pm 1,9$ % im Striatum und $11,3 \pm 2,1$ % in der CA1-Region und $10,0 \pm 1,6$ % in der CA3-Region des Hippokampus ($p < 0,05$, Abb. 16 und 17). Die Gabe von Betamethason erhöhte die Zunahme der GLUT1-IR im frontalen Neokortex um $5,4 \pm 0,3$ %, im Striatum um $4,7 \pm 0,3$ % und in der CA1- und CA3-Region des Hippokampus um $6,3 \pm 1,1$ % und $4,9 \pm 0,9$ % ($p < 0,05$; Abb.17).

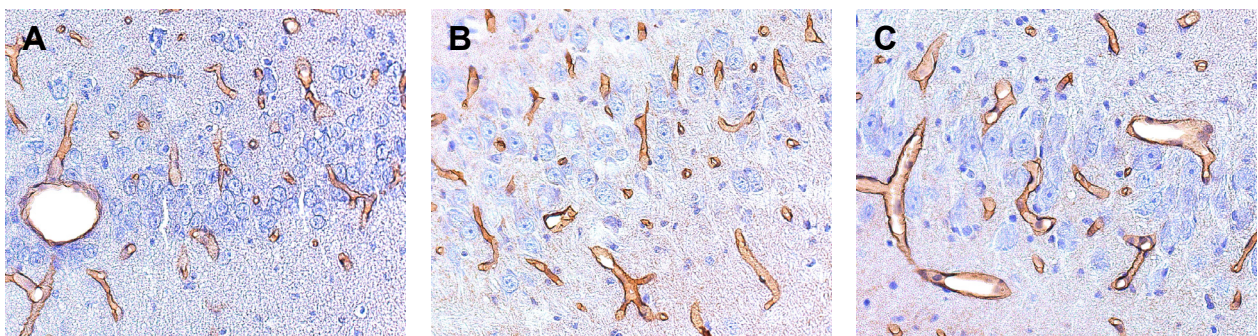


Abb.16 Immunmarkierung von GLUT1 (braunes Präzipitat bei Hämatoxylingegenfärbung zur Visualisierung der Nuklei) beispielhaft für die CA1-Region des Hippokampus. Die GLUT1-IR im Endothel der Mikrogefäße ist nach fetaler Asphyxie erhöht (B) und wird durch die Gabe von Betamethason noch verstärkt (C).

A= scheinoperierte Feten, B=Kontrolltiere, C=mit Betamethason behandelte Tiere

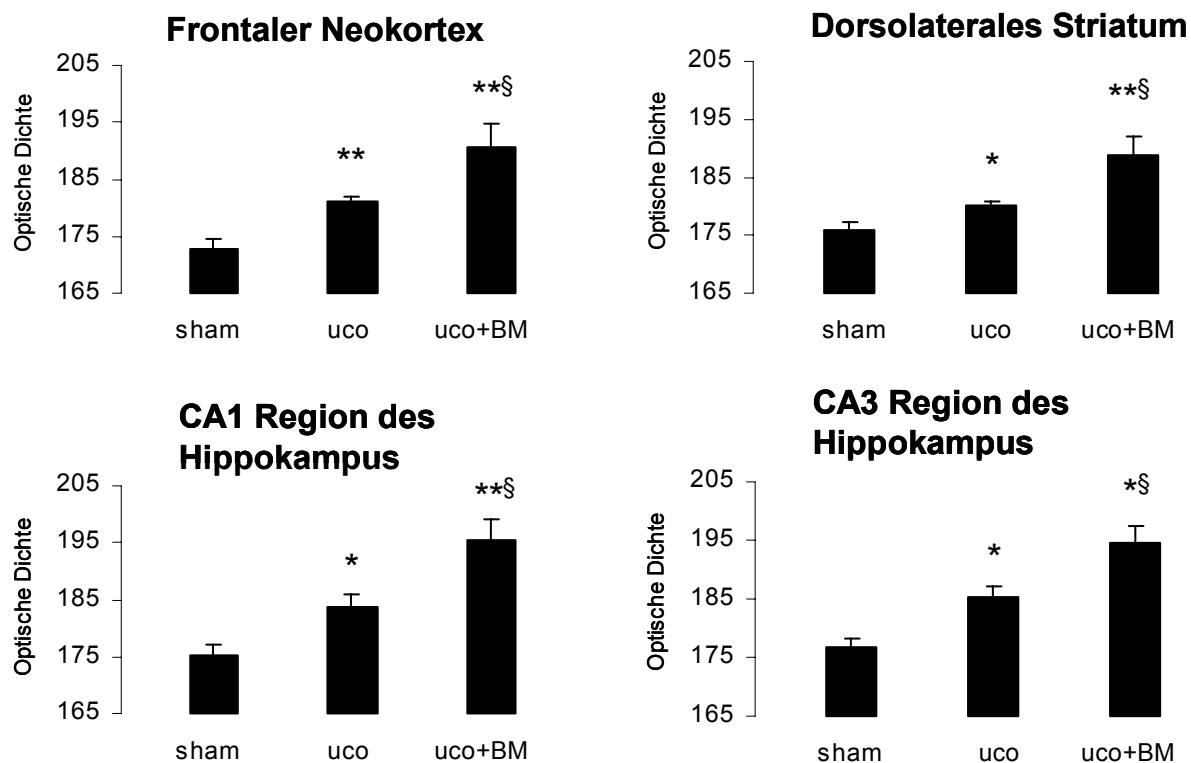


Abb.17 GLUT1-Immunreaktivität (IR) 24 h nach einer repetitiven Nabelschnurokklusion (uco, 4 x 4 min im Abstand von 30 min). Betamethason (BM) verstärkt den post – asphyktischen Anstieg der GLUT1 – IR in den untersuchten Regionen.

MW+SEM; sham_scheinoperierte Feten (n=7); uco_Nabelschnurokklusion bei NaCl-Infusion (n=7); uco+BM_Nabelschnurokklusion bei Betamethasoninfusion (n=7); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ scheineroperierte Feten vs. Kontrolltiere/ mit BM behandelte Tiere nach Nabelschnurokklusion; § $p < 0,05$ Kontrolltiere vs. mit Betamethason behandelte Feten

Die GLUT3-IR wurde in Form einer dichten Färbung in den Neuronen des zerebralen frontalen Neokortex, des Striatums und des Hippokampus gefunden. In den nekrotischen Regionen des parasagittalen Kortex und des Hippokampus war keine neuronale Immunmarkierung von GLUT3 erkennbar.

Eine Nabelschnurokklusion führte in den nekrosefreien Regionen zu einem Anstieg der GLUT3-IR. Im frontalen Neokortex wurde gegenüber den scheinoperierten Feten ein Anstieg auf $202,7 \pm 17,6 \%$, im Striatum auf $221,8 \pm 10,9 \%$, in der CA1-Region des Hippokampus auf $171,4 \pm 16,5 \%$ und in der CA3-Region des Hippokampus auf $146,8 \pm 14,4 \%$ erreicht ($p < 0,05$, Abb.19). Die Gabe von Betamethason führte ebenfalls zu einem Anstieg im frontalen Neokortex auf $249,6 \pm 12,9 \%$, im Striatum auf $271,4 \pm 18,0 \%$, in der CA1-Region des Hippokampus auf $207,1 \pm 9,7 \%$ und in der CA3-Region des Hippokampus auf $99,7 \pm 14,9 \%$. Dieser Anstieg war tendenziell stärker als bei den Kontrolltieren, erreichte jedoch keine Signifikanz im Vergleich zum Anstieg der GLUT1-IR (Abb. 18 und 19).

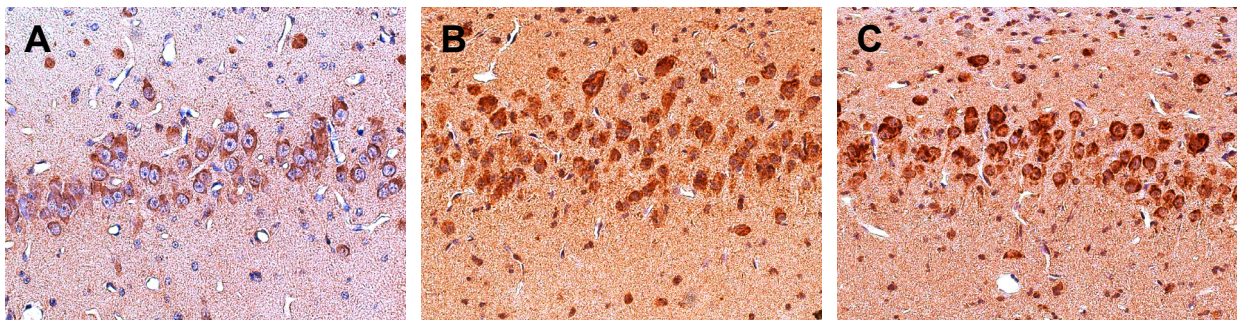


Abb.18 Immunmarkierung von GLUT3 (braunes Präzipitat bei Hämatoxylingegenfärbung zur Visualisierung der Nuklei) am Beispiel der CA1-Region des Hippokampus. Die GLUT3-IR in den Neuronen ist nach fetaler Asphyxie erhöht (B), bleibt nach der Gabe von Betamethason jedoch unverändert (C).
A= scheinoperierte Feten, B=Kontrolltiere, C=mit Betamethason behandelte Feten

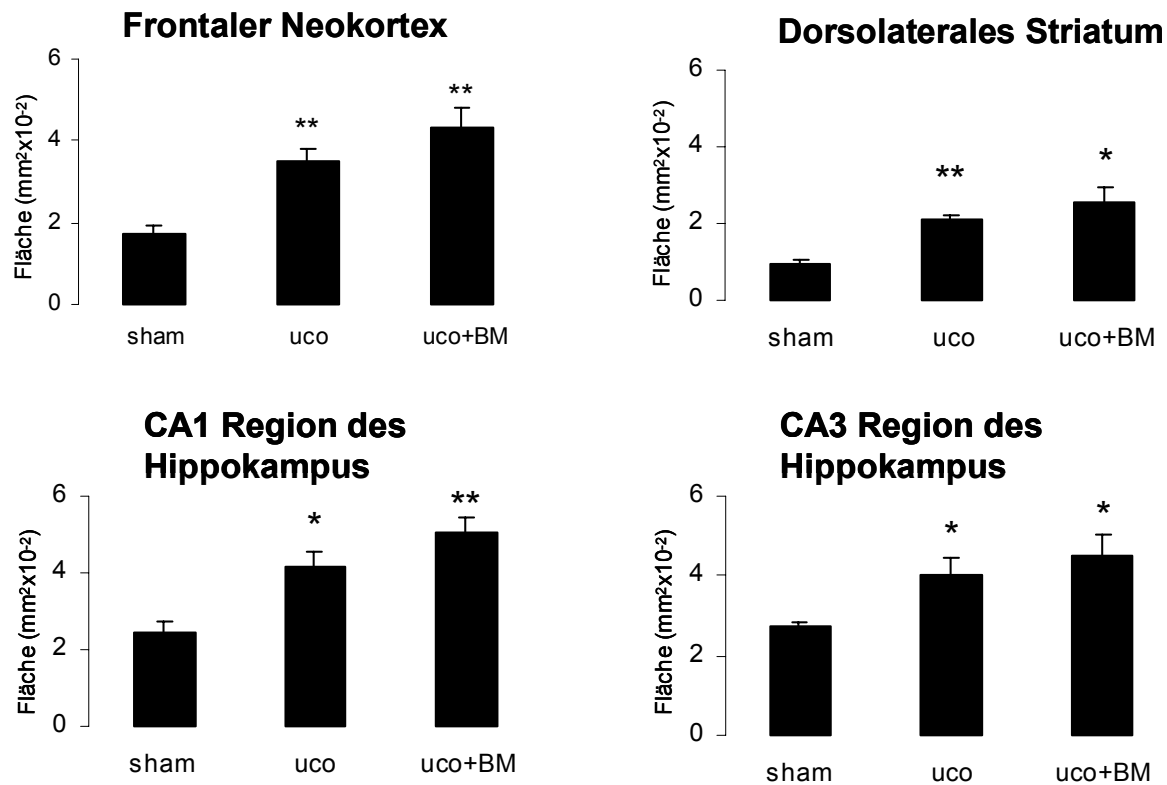


Abb.19 GLUT3-Immunreaktivität (IR) 24 h nach einer repetitiven Nabelschnurokklusion (uco, 4 x 4 min im Abstand von 30 min) und deren Beeinflussung durch Betamethason (BM).
 MW+SEM; sham_scheinoperierte Feten (n=7); uco_Nabelschnurokklusion bei NaCl-Infusion (n=7); uco+BM_Nabelschnurokklusion bei Betamethasoninfusion (n=7); * p<0,05; ** p<0,01 scheinooperierte Feten vs. Kontrolltiere/ mit Betamethason behandelte Feten

5 Diskussion

5.1 Methodendiskussion

5.1.1 Tiermodell

Die ersten Beobachtungen von Mount Liggins über die Effekte einer antenatalen Glukokortikoidapplikation beim frühgeborenen Feten erfolgten am fetalen Schaf und führten zur Etablierung dieses Tiermodells für die perinatale Glukokortikoidtherapie (Liggins, 1969; Liggins & Howie, 1972). Das fetale Schaf hat sich seitdem als Tiermodell für die menschliche Fetalperiode bewährt und ist somit seit mehr als 30 Jahren bei der Untersuchung zahlreicher physiologischer und pathophysiologischer Fragestellungen hinsichtlich der menschlichen Fetalperiode relevant. Beim Schaf sind im allgemeinen Einlings- oder Zwillingsträchtigkeiten zu erwarten. Die Größe und Robustheit der Feten erlaubt im Gegensatz zu Kleinnagern und Primatenfeten eine umfangreiche Instrumentierung und damit die Durchführung der Studie. Die Muttertiere tolerieren die chirurgische Instrumentierung gut. Untersuchungen am fetalen Schaf haben sich immer wieder als eine solide Basis für klinische Studien erwiesen. Der zeitliche Ablauf der intrauterinen Entwicklung ähnelt der des menschlichen Feten, wenn auch das Schafgehirn zur Geburt reifer als das menschliche Gehirn ist (Astrom, 1967; Dobbing & Sands, 1979). Untersuchungen an nichtmenschlichen Primaten sind aus tierschutzmäßigen, technischen und finanziellen Gründen oft nicht möglich.

Am fetalen Schaf lässt sich eine perinatale Hirnschädigung mit den für den menschlichen Feten typischen Schädigungsmustern modellieren (siehe 2.4.1). Eine perinatale Asphyxie lässt sich bei postnatalen Hirnentwicklern wie der Ratte nur unzureichend modellieren, da wesentliche Aspekte wie z.B. die beschleunigte Maturation der Mitochondrien, die mit dem erhöhten Sauerstoffpartialdruck nach der Geburt einhergeht, der Situation *in utero* entgegen stehen (Almeida et al., 2001). Zudem kann von Untersuchungen am adulten Gehirn nicht auf die fetale Situation geschlossen werden, da die Hirnentwicklung zur Geburt noch nicht abgeschlossen ist, z.B. aufgrund der

fehlenden Myelinisierung oder der Unreife der Gefäße, welche durch Ruptur zu post-asphyktischen intraventrikulären Hämorrhagien führen können. So bestehen sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede zwischen den Schädigungsmustern und den Glukokortikoideffekten bei Feten und Adulten. Es gibt natürlich auch Unterschiede zwischen den Spezies Schaf und Mensch. Das Schaf weist eine sogenannte Placenta epitheliochordalis auf, bei der alle Schichten der Plazenta aufzuweisen sind, d.h. das mütterliche Blutgefäßendothel, das Uterusepithel, das Chorionepithel und das fetale Blutgefäßendothel einschließlich ihrer Basalmembranen. Bei der Placenta haemomonochorialis des Menschen hat sich das einschichtige Chorionepithel zum Synzytium umgewandelt (Schnorr, 1996). So wurde die Dosierung von Betamethason gewichtsadaptiert berechnet und direkt in die fetale Vena jugularis infundiert.

5.1.2 Verwendete Glukokortikoide und Applikationsform

Den Dosisempfehlungen der NIH (NIH Consensus Statement, 2000) für die klinische Anwendung von Betamethason folgend, wurde Betamethason der behandelten Gruppe über 48 Stunden verabreicht. Mit der gewählten Dosierung konnte im fetalen Blut eine Plasmakonzentrationen erreicht werden (Schwab et al., 2004; Derks et al, 1997), die denjenigen Wirkspiegeln entsprachen, die im Plasma der humanen Nabelschnur 24 h nach mütterlicher Glukokortikoidbehandlung gemessen wurden (Petersen et al., 1980; Kream et al., 1983). Für die Gewichtsabschätzung existieren in unserem Labor Wachstumskurven der verwendeten Feten zwischen 100 und 140 dGA auf der Grundlage von über 250 Feten.

Das verwendete Protokoll imitiert die klinische Situation, in der Glukokortikoide bei einer drohenden Frühgeburt verabreicht werden und eine perinatale Asphyxie häufig unter der einige Stunden nach Betamethasongabe beginnenden Geburt auftritt. Die repetitive Nabelschnurokklusion ist eine häufige klinische Ursache einer perinatalen Asphyxie (Shields & Schiffrin, 1988).

5.1.3 Asphyxiemodell

5.1.3.1 *Abhängigkeit der Hirnschädigung vom Gestationsalter*

Im Gegensatz zum adulten Gehirn korreliert die Hirnschädigung im fetalen Gehirn zum mangelnden Substratangebot, da bei ihnen primär ein Substratmangel im Gehirn und erst sekundär der Sauerstoffmangel für einen Hirnschaden verantwortlich ist (Yager & Thornhill, 1997). Das Gestationsalter spielt dabei eine entscheidende Rolle bezüglich der Manifestation des hypoxischen Hirnschadens. Eine perinatale Hirnschädigung mit der für den menschlichen Feten zwischen der 23. und der 32. SSW typischen primären Schädigung der weißen Substanz (Towbin, 1998) sowie der zunehmenden Vulnerabilität der grauen Substanz nach der 32. SSW lässt sich am fetalen Schaf nachbilden (Barkovich et al., 1992; Volpe, 2000). Dies ist jedoch ein dynamischer Prozess, welcher von vielen Faktoren abhängig ist und keine klare Trennung zwischen den beiden Schädigungsmustern zulässt. Mallard et al. (1994) zeigten am Modell einer 10 -minütigen vollständigen Nabelschnurokklusion, dass die Gehirne unreifer Schaffeten (0,6 der Gestationsdauer) von Neuronenuntergängen im Hippokampus weniger betroffen sind als die reifer Feten (0,9 der Gestationsdauer). Eine Schädigung der weißen Substanz wurde jedoch weder bei den älteren noch bei den jüngeren Tieren beschrieben. In einer zweiten Studie wurde durch eine 30 -minütige bilaterale Okklusion der Aa. carotis communis bei unreifen Schaffeten (0,65 der Gestationsdauer) eine Schädigung sowohl der grauen als auch der weißen Substanz ausgelöst, während bei den reifen Schaffeten (0,9 der Gestationsdauer) ausschließlich die graue Substanz geschädigt war (Reddy et al., 1998). Das Alter unserer Versuchstiere entspricht am Tag der Asphyxie dem 126. Trächtigkeitstag (0,84 der Gestationsdauer). Dies entspricht der 32. SSW des Menschen und damit einem Zeitpunkt, zu welchem eine Frühgeburt häufig auftritt und die Gabe von Glukokortikoiden zur klinischen Anwendung kommt. Diese wird bis zur 34. SSW empfohlen (NIH Consensus Statement, 2000). Aufgrund der im Vergleich zum menschlichen Feten schnelleren intrauterinen Hirnreifung sind beim Schaffeten in diesem Gestationsalter der parasagittale Kortex und der Hippokampus besonders vulnerabel gegenüber

einer Asphyxie (Berger & Garnier, 1999). Aber auch beim Menschen nimmt die Vulnerabilität der grauen Substanz gegenüber einer Asphyxie nach der 32. SSW zu (Barkovich et al., 1992; Volpe, 2000). Die Gehirne unreifer Schaffeten sind weniger vulnerabel gegenüber einer Asphyxie als die Gehirne reifer Feten (Keunen et al., 1997). Um eine primäre Schädigung der weißen Substanz zu erzielen, muss beim fetalen Schaf zum Zeitpunkt 0,6 der Gestationsdauer eine mindestens 10 -minütige vollständige Nabelschnurokklusion durchgeführt werden, die jedoch die Gefahr des Tierverlustes birgt (Mallard et al., 1994). Als Kompromiss zwischen einem kliniksnahen Asphyxiemodell, dem Stand der Hirnreifung, der Vulnerabilität des fetalen Gehirns und dem Zeitpunkt der Betamethasonbehandlung haben wir das verwendete Gestationsalter (0,84 des Trächtigkeitsalters) für unsere Untersuchungen ausgewählt. Da im untersuchten Gestationsalter eine primäre Schädigung der weißen Substanz nicht mehr auftritt, konzentrierten wir uns in dieser Arbeit auf die Untersuchung des parasagittalen Kortex, des Hippokampus und zum Vergleich des frontalen Neokortex und des Striatums.

5.1.3.2 Standardisierung der Hirnschädigung

Zur Verifizierung der stattgehabten Nabelschnurokklusionen und zur Bewertung des Zustandes des Feten wurden die arteriellen Blutgase, die Glukose und das Laktat kontrolliert. Die Blutgaswerte der Feten während der Nabelschnurokklusionen zeigten die typischen Zeichen einer Hypoxie, d.h. der arterielle pH, der Sauerstoffpartialdruck und die Sauerstoffsättigung sanken, während der Kohlendioxidpartialdruck und das Laktat anstiegen. Eine Sauerstoffsättigung unter 20 - 25% und ein Abfall des pH-Wertes auf 6,9 – 7,2 bedeuten eine vollständige Nabelschnurokklusion und damit eine Asphyxie der Feten beider Versuchsgruppen. Tiere, die dieses Kriterium nicht erfüllten, wurden in die Studie nicht aufgenommen.

5.1.3.3 Methodisch bedingte zerebrale Schädigungen

Prinzipiell sind hypoxische Schädigungen während des gesamten Versuchsablaufes von der Instrumentierung bis zur Sektion möglich. Diese konnten jedoch weitgehend ausgeschlossen werden durch langjährige

Operationserfahrung mit der Vermeidung von Nabelschnurabklemmungen und einer Sauerstoffgabe von 100 % während der Instrumentierung, einer kontinuierlichen Aufzeichnung von Blutdruck und Herzfrequenz als Indikatoren für Hypoxien sowie das Monitoring von Uteruskontraktionen, welche physiologisch alle 20 Minuten während der Schwangerschaft auftreten. Um eine mögliche Hypoxie während der Sektion auszuschließen, wurden die Muttertiere unmittelbar nach Abschluß der experimentellen Phase mit 4% Halothan in 100% O₂ narkotisiert und das fetale Gehirn sofort nach Tötung des Feten entnommen. Das fetale Gehirn wurde sofort nach Exsanguination über die Arteria carotis communis und kurzem Spülen in NaCl mit neutral gepufferter 4% Paraformaldehydlösung perfusionsfixiert, womit post-mortale Veränderungen weitgehend ausgeschlossen werden sollten. Bei der Freipräparation des fetalen Gehirns aus dem Schädel konnten aber trotz sorgfältiger Arbeit Druckschäden entstanden sein, welche auch post-mortal zu neuronalen Zelluntergängen führen (Cammermeyer, 1962). Deshalb wurden zur Detektion experimentell bedingter Hirnschädigungen scheinoperierte Tiere mitgeführt. Die leichte insbesondere kortikale Hirnschädigung dieser Tiere weist darauf hin, dass eine generelle Schädigung nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte. Das sind am ehesten parasagittale Druckschäden, welche jedoch auf das Gesamtergebnis keinen Einfluß haben, da zu scheinoperierten und nicht zu vollständig unbeschädigten Tieren verglichen wurde.

5.1.4 Nachweis zerebraler Strukturproteine und ihrer Schädigung

Zum Nachweis der ischämischen Zelluntergänge ist HE eine geeignete und allgemein genutzte Färbung, da sich die nekrotischen Neurone durch ein stark eosinophiles Zytoplasma und ein dreiecksförmig ausgezogenes Perikaryon mit pyknotischen, chromatindichten Kernen erkennen lassen (Towbin, 1998). Unter der Anwendung moderner immunhistochemischer Methoden war es möglich, die ischämie-sensitiven zytoskelettalen Proteine MAP1B (Tucker et al., 1990), MAP2 (Tanner et al., 2000), Synaptophysin (Ovtscharoff et al., 1993) sowie die Glukosetransportproteine GLUT1 und GLUT3 (Vannucci et al, 1994) am fetalen Schaf 24 h nach einer repetitiven Nabelschnurokklusion nachzuweisen. Unsere Untersuchungen konzentrierten sich auf eine semiquantitative Analyse der

Immunmarkierung als Ausdruck deren Proteinexpression. Dabei können wir annehmen, dass eine wachsende Proteinkonzentration mit steigender Antigenität einhergeht. Von den Glukosetransportproteinen ist bekannt, dass ihre Transportkapazität direkt von der Proteinexpression abhängt. Die Proteinexpression ließe sich neben der Immunhistochemie auch quantitativ mittels Western Blot nachweisen, jedoch erlaubt diese Methode nicht die Darstellung der histochemischen Verteilung des Proteins. Unsere Fragestellung galt jedoch insbesondere des Schädigungsmusters. Da der Western Blot am nativen Gewebe erfolgt, sind beide Untersuchungsmethoden nicht am gleichen Gewebe durchführbar. Wir haben uns für die immunhistochemische Methode entschieden. Die Spezifität der Antikörper wurde, wie im Methodenteil beschrieben, durch die Hersteller detailliert beschrieben. Die semi-quantitativen Analysen aus der Immunhistochemie wurden nach umfangreichen Referenzen sichergestellt (Masliah et al., 1990; Gschanes et al., 2000; Schwab et al., 2001; Colberg et al., 2004; Antonow-Schlorke et al., 2001, 2003, 2006-Nsci.Lett.). Außerdem verfügt unsere Arbeitsgruppe über viel Erfahrung bei der reproduzierbaren Erstellung der Immunmarkierungen und bei der Quantifizierung (Antonow-Schlorke et al., 2001; 2003; 2006; Schwab et al., 2001). Die Spezifität der Antikörper wurde, wie im Methodenteil beschrieben, durch die Hersteller sichergestellt.

Die Messung der Fläche der Immunmarkierung wurde bevorzugt, da damit z.B. Färbungsartefakte, die bei der Bestimmung der optischen Dichte zu berücksichtigen wäre, weitgehend ausgeschlossen werden können. Für die Expression von GLUT1 war die Flächenmessung nicht möglich (siehe Methoden), deshalb wurde die für die Dichtemessung problematische gleichmässige Markierung, z.B. durch ein einheitliches Färbeprotokoll mit großer Bestückung an Schnitten versucht zu erreichen. Eine Auswirkung der Probleme der Dichtemessung auf die Ergebnisse wurde durch das Mitführen von Negativkontrollen weitgehend ausgeschlossen.

5.1.5 Relevanz des Asphyxiemodells

Da eine wiederholte Nabelschnurokklusion, ausgelöst durch eine fetale Rotation oder Kompression, häufig eine klinische Ursache der perinatalen Asphyxie ist

(Shields & Schifrin, 1988), wurde sie als Asphyxiemodell für die Untersuchungen gewählt. Die Voruntersuchungen unserer und die Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen (Bocking, 1993) demonstrieren, dass eine repetitive Nabelschnurokklusion für 4 x 4 min im Abstand von jeweils 30 min eine fetale Asphyxie mit einer reproduzierbaren Hirnschädigung beim fetalen Schaf im zu untersuchenden Gestationsalter bewirkt, ohne dass der Fetus an der Asphyxie verstirbt. Die Nabelschnurokklusion erfolgte mittels eines aufblasbaren Nabelschnurokkluders 24 h nach Beginn der Betamethasoninfusion, d.h. nach dem Erreichen einer konstanten Glukokortikoidkonzentration im fetalen Blut (Schwab et al., 2004).

Generell scheint eine Asphyxie im vorliegenden Gestationsalter (0,84 der Gestationsdauer) die Schädigungsmuster relativ unabhängig von der Asphyxiedauer hervorzurufen. Nach einer 10 -minütigen Nabelschnurokklusion am fetalen Schaf (124 dGA; 0,83 der Gestationsdauer) fanden sich neben neuronalen Nekrosen im Hippokampus (Fujii et al., 2003) auch pyknotische Zellen im parietalen Kortex, Putamen, Nucleus caudatus und den Purkinjezellen des Zerebellums (Castillo-Melendez et al., 2004). Tunel-positive Zellen, welche den apoptotischen Zelltod markieren, waren bei Schaffeten zum Zeitpunkt 0,9 der Gestationsdauer nach intermittierenden Nabelschnurokklusionen über 3 - 5 h in Zerebellum, Pons, Kortex und Hippokampus zu beobachten (Falkowski et al., 2002). Den Effekt intermittierender asphyktischer Episoden untersuchten auch Mallard et al. (1993; 1995; 2003) nach sowohl 3 x 10 min als auch 4 x 5 min im Abstand von 30 Minuten Nabelschnurokklusion an 123 – 130 dGA (0,82 – 0,86 der Gestationsdauer) fetalen Schafen. Sie fanden neuronale Schäden im parasagittalen Kortex, Hippokampus und Striatum.

Eine mütterliche Hypoxie (Vorversuche der eigenen Arbeitsgruppe) oder die partielle Nabelschnurokklusion (Ikeda et al., 2000) führte nicht zu einer reproduzierbaren Hirnschädigung. Nach einer Okklusion der uterinen Arterien wurden eine primäre Schädigung des zerebralen Kortex und des Hippokampus beschrieben (Rees et al., 1997). Eine 30 minütige Kompression beider Aa. Carotis communis bewirkt eine reproduzierbare Hirnschädigung im parasagittalen Kortex beim fetalen Schaf (0,86 der Gestationsdauer; Berger & Garnier et al., 1999). Die Verwendung eines Ischämie Modells ausgelöst durch

die Okklusion beider Aa. Carotis communis kam aufgrund der geringen klinischen Relevanz als Modell für uns nicht in Frage.

Unser Modell hat sich aufgrund der Reproduzierbarkeit der Hirnschäden als auch aufgrund der Relevanz bei der Induktion der Asphyxie bewährt.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Zerebrale Hirnschädigung nach einer fetalen Asphyxie und Reperfusion

Zwischen der Kontrollgruppe und den mit Betamethason behandelten Feten war die Ausprägung der Asphyxie gemessen anhand der Blutgase gleich.

Die Rückkehr der Blutgase und Laktatwerte innerhalb von 2 h auf die Ausgangswerte bei den Kontrolltieren zeigt die schnelle Erholungsfähigkeit der Feten nach hypoxisch-ischämischen Ereignissen. Zwischen den beiden experimentellen Gruppen mit Nabelschnurokklusion ergaben sich keine Unterschiede im Vergleich der Blutgase vor und während und nach der Asphyxie.

Bei den Kontrolltieren zeigten sich während und nach der Asphyxie keine veränderten Glukosespiegel, jedoch ein Laktatanstieg während der Nabelschnurokklusionen, der jedoch schon 2 h später nicht mehr nachweisbar war. Berger et al. (1996) induzierten einen ischämischen Hirnschaden durch Okklusion beider Aa. carotis communis für 30 min am chronisch instrumentierten Schaf am 129 dGA (0,86 der Gestationsdauer). Dabei wurde ein Anstieg der Plasmakonzentrationen von Glukose und Laktat während der Ischämie beobachtet, der sich innerhalb von 72 h wieder normalisierte (Berger et al., 1996). Die Glukose- und die Laktatwerte in unserer Studie waren schneller rückläufig, möglicherweise als Ausdruck der kürzeren Asphyxie im Vergleich zu einer langen zerebralen Ischämie.

Die durch Betamethason erhöhte Glukosekonzentration 2 h vor und 2 h nach der letzten Nabelschnurokklusion wie auch der erhöhte und länger anhaltende Laktatanstieg nach Asphyxie weisen auf ein erhöhtes Substratangebot und/oder eine verstärkte anaerobe Glykolyse als Antwort auf den Sauerstoffmangel gegenüber den Kontrolltieren hin. Bekanntermaßen wird der Glukoseanstieg z.B. durch vermehrte glukokortikoidbedingte Glukoneogenese hervorgerufen (Kaufmann & Löhr, 1992). Der dagegen 2 und 24 h nach der Asphyxie auch bei den Betamethason behandelten Tieren wieder im Normalbereich liegende pH-Wert lässt sich möglicherweise durch eine Abpufferung des Laktats über

intrazelluläre Mechanismen erklären. Die Aufrechterhaltung der Glykolyse während der Nabelschnurokklusion erhält das zerebrale Adenosintriphosphat (ATP), so dass Glukokortikoide einen gewissen Schutz gegenüber hypoxisch-ischämischen Hirnschäden darstellen (Tuor et al. 1997).

5.2.2 Pathophysiologie der hypoxischen zerebralen Schädigung

Eine schwere fetale Asphyxie führt beim Feten zunächst durch Aktivierung des sympathikoadrenergen Systems zu einer Umverteilung des Herzzeitvolumens zugunsten der zentralen Organe wie Gehirn, Herz und Nebennieren (Towbin, 1998). Im Vergleich zur perinatalen Hypoxie kommt es während einer perinatalen Asphyxie aufgrund des zusätzlichen Anstiegs des Kohlendioxidpartialdrucks zu einer verstärkten Stimulierung der arteriellen Chemorezeptoren und des Nebennierenmarks (Hanson, 1988). Der erniedrigte Sauerstoff- und der erhöhte Kohlendioxidpartialdruck führen initial zu einer zerebralen Vasodilatation und damit zu einer Durchblutungssteigerung (Jensen & Schumacher, 1987). Die zerebrale Hyperperfusion betrifft hauptsächlich den Hirnstamm (Jensen & Berger, 1991), im zerebralen Kortex sinkt die Durchblutung schon unmittelbar nach Beginn der Nabelschnurokklusion (Müller et al., 2002). Besteht ein verstärkter Sauerstoffmangel, setzt die anaerobe Glykolyse ein. Dabei nimmt die lokale Laktatkonzentration zu und senkt den pH-Wert des Hirngewebes. Kommt aufgrund des akuten Sauerstoffmangels die oxidative Phosphorylierung im Gehirn zum Erliegen, steht keine Energie für die $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -Pumpe zur Aufrechterhaltung des Ionengradienten an der Zellmembran zur Verfügung. Nach dem Verlust des Membranpotentials dringen über spannungsabhängige Ionenkanäle große Mengen an Kalzium in die Zelle ein. Dieser starke Kalziumeinstrom in die Neurone wie auch der Anstieg des Prostaglandinmetabolismus, die Bildung von freien Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid verursachen eine Zellschädigung durch die Aktivierung von Proteasen, Lipasen und Endonukleasen (Guzzetta, 1991).

Ferner spielt neben der unmittelbaren asphyktischen Schädigung auch ein sekundärer neuronaler Zellschaden, ausgelöst durch die Reperfusionsphase eine Rolle. Dieser sich wenige Stunden an den hypoxisch-ischämischen Insult anschließende Zellschaden wird vermutlich durch die post-asphyktische

Freisetzung von Sauerstoffradikalen, durch die Aktivierung von Stickstoffmonoxid, durch die Aktivierung von Entzündungsmediatoren sowie durch Apoptose hervorgerufen (Berger & Garnier, 1999; Fellmann & Raivio, 1996). Die Perfusionsfixierung der Gehirne erfolgte 24 h nach der Asphyxie (und damit unmittelbar nach Ende der Betamethasoninfusion, Abb.1), um den Reperfusionsschaden (Berger & Garnier, 1999, siehe oben) zu berücksichtigen und die Demarkierung des Hirnschadens abzuwarten. Deshalb können wir nicht zwischen primärer Zellschädigung während der Nabelschnurokklusionen und sekundärer Zellschädigung durch Reperfusion differenzieren. Wahrscheinlich ist der Proteinverlust primär auf die Asphyxie zurückzuführen, da die untersuchten Proteine, insbesondere die MAPs, als sehr empfindlich gegenüber einer Ischämie gelten und ein Verlust unmittelbar nach dem ischämischen Ereignis nachweisbar ist (Malinak & Silverstein, 1996; Blomgren et al., 1995; Ota et al., 1997).

5.2.3 Muster der zerebralen Hirnschädigung

5.2.3.1 Vulnerable Hirnregionen

Die Okklusionen der Nabelschnur führten übereinstimmend mit der Literatur zu den für eine fetale Asphyxie typischen Schädigungsmustern, die auch experimentell am Schaffeten beschrieben sind:

1. Zum einen das Schädigungsmuster des parasagittalen Kortex, welches definiert ist durch die Präsenz kortikaler und subkortikaler Nekrosen vor allem in der parietalen und okzipitalen Region (Towbin, 1998). Sie wird als Folge der Besonderheiten während der kortikalen Gefäßentwicklung bei der Ausformung der Sulci bewertet (Berger & Garnier, 1999). Am Übergang von der grauen zur weißen Substanz werden die penetrierenden Versorgungsgefäße in eine spitzwinklige Krümmung gezwungen, wodurch ein dreieckiges Areal am Boden der Sulci kaum von Gefäßen durchzogen ist und bei Abfall der Perfusion hauptsächlich geschädigt wird (Takashima et al., 1978).

2. Es zeigten sich selektive Nekrosen im Hippokampus vor allem der CA1- und CA3- Region (Fujii et al., 2003; Castillo-Melendez et al., 2004). Mögliche Mechanismen für die erhöhte Vulnerabilität dieser Regionen sind z.B. die geringere Perfussion der Mikrokapillaren im Hippokampus (Imdahl & Hossmann, 1986) und die unterschiedliche vaskuläre Anatomie (Schmidt–Kastner & Hossmann, 1988).

5.2.3.2 *Effekte der Asphyxie auf das neuronale Zytoskelett*

Die durch eine 4 x 4 -minütige Nabelschnurokklusion im Abstand von 30 min ausgelöste fetale Asphyxie führte zu einem Verlust der MAP1B- und MAP2-IR am fetalen Schaf (0,84 der Gestationsdauer). Der Verlust der MAP1B- und MAP2-IR war in den Regionen neuronaler Nekrosen des parasagittalen Kortex und des Hippokampus vollständig. Der Verlust in den nekrosefreien Regionen deutet sowohl auf eine strukturelle als auch eine funktionelle Störungen hin (Schwab et al., 1998), denn MAP1B und MAP2 gelten als frühe sensitive Marker eines ischämischen Zellschadens im somatodendritischen Kompartiment im juvenilen Gehirn (Blomgren et al., 1995; Malinak & Silverstein, 1996; Ota et al., 1997). Deshalb ist die ischämische Hirnschädigung wahrscheinlich primär durch die Nabelschnurokklusionen bedingt und keine Folge der Reperfusion.

Welcher Art die Veränderungen von MAP1B und MAP2 sind, die sich in einem Verlust der IR widerspiegeln, kann hier nicht geklärt werden. Eine Hypothese ist, dass die ischämie–abhängige Elevation von intrazellulärem Kalzium zu einer proteolytischen Degradation durch kalziumaktivierte Proteasen, wie Calpain, führt (Matesic & Lin, 1994; Pettigrew et al., 1996). Insbesondere MAP2 ist gegenüber Calpain sehr sensitiv (Johnson et al., 1991). In der Literatur wird ein Verlust von MAP2 häufig in Korrelation mit einer neuronalen Degeneration beschrieben, wobei der MAP2–Verlust dem Zellverlust vorangeht (Matesic und Lin, 1994).

Alternativ kann der Verlust von MAP auch auf Veränderungen des Epitops, welches die von uns verwendeten Antikörper erkennt, oder der Sekundärstruktur durch einen veränderten Phosphorylierungszustand nach

Ischämie, zurückzuführen sein (Freitas et al., 1995; Colbran et al., 1997). Die hier genutzten Antikörper diskriminieren den Phosphorylierungsstatus des Proteins jedoch nicht.

Weiterhin können wir nicht sagen, ob der Verlust der MAP-IR in den nekrosefreien Regionen reversibel ist oder nicht (Schwab et al., 1998).

5.2.3.3 *Effekte der Asphyxie auf Synaptophysin*

Synaptophysin gilt als Markerprotein für die Dichte präsynaptischer Endigungen (Masliah et al., 1990) und ist mit Beginn der Synaptogenese im fetalen Gehirn des Menschen bereits in der 20. Gestationswoche (0,53 der Gestationsdauer) nachweisbar (Grunnet, 1995). Die Zahl kortikaler Synapsen steigt, wie insbesondere auch an nichtmenschlichen Primaten gezeigt werden konnte, in den letzten beiden Trächtigkeitsmonaten rapide (Rakic et al., 1986).

Bisher wurde ausschließlich im reifen Nagergehirn demonstriert, dass Synaptophysin vulnerabel gegenüber einer zerebralen Ischämie ist (Martinez et al., 1997). Zu möglichen Veränderungen von Synaptophysin-IR nach fetaler Asphyxie gibt es in der Literatur bisher keine Erkenntnisse. In dieser Studie wurde ein Verlust der Synaptophysin-IR nach fetaler Asphyxie, ausgelöst durch Nabelschurokklusionen, im zerebralen Neokortex, im Striatum und im Hippokampus beobachtet. Der genaue Mechanismus, der zu einem Verlust der Synaptophysin-IR führt, ist bisher nicht bekannt. Möglicherweise geht der Verlust der Synaptophysin-IR und damit der Synapsen (Wiedenmann & Franke, 1985; Navone et al., 1986) mit einem Verlust an Dendriten einher, welche an diese Synapsen gekoppelt sind.

5.2.3.4 *Effekte der Asphyxie auf die Glukosetransportproteine*

Es liegen derzeit nur wenige Studien vor, welche die Glukosetransportproteine GLUT1 und GLUT3 im sich entwickelnden Gehirn unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen zum Gegenstand der Untersuchung haben. Nach Hypoxie wurde ein Anstieg der GLUT1-mRNA (Xia et al., 1995) und der GLUT3-mRNA (Royer et al., 2000) im fetalen und neonatalen Gehirn (Jones & Bergeron, 2001) von Ratten gefunden, gefolgt von einer gesteigerten Proteinexpression (Jones & Bergeron, 2001; Vannucci et al., 1996).

Unserem Wissen nach ist diese Studie die erste, welche zerebrale Glukosetransportproteine nach Asphyxie im sich entwickelnden Gehirn *in utero* untersucht. 24 Stunden nach repetitiver Nabelschnurokklusion zeigte sich ein deutlicher Anstieg von der GLUT1- und von der GLUT3-IR in den nekrosefreien Regionen. In den geschädigten Regionen zeigte sich für GLUT1 ebenfalls eine Aufregulation, während GLUT3 nicht mehr nachweisbar war. Der Nachweis von GLUT1 in den Endothelzellen der zerebralen Mikrogefäße auch innerhalb der Nekrosen spiegelt die erhöhte Ischämieresistenz der Endothelzellen im Vergleich zu den Neuronen wider. und erklärt den fehlenden asphyktischen GLUT1-Verlust in der Bluthirnschranke.

Die 55kDa GLUT1-Isoform ist für den Glukosetransport durch das Endothel der Bluthirnschranke und die Glukoseutilisation im sich entwickelnden Gehirn limitierend (Pardridge et al., 1990; Vannucci et al., 1994) und ließ sich in Übereinstimmung mit der Literatur im Endothel der zerebralen Mikrogefäße nachweisen (Dick et al. 1984, Gerhart et al. 1989, Maher et al. 1993, Vannucci & Simpson, 2003). GLUT1 wurde bereits im Gehirn reifer Schaffeten mittels Western Blot nachgewiesen (Anderson et al., 2001). Im menschlichen Feten wurde GLUT1 schon ab der 8. SSW analysiert und als essentielles Protein der Gehirnentwicklung und –funktion beschrieben (Nualart et al., 1999). Andererseits scheint GLUT3, welches hauptsächlich neuronal exprimiert wird (McCall et al., 1994), nicht vor der 21. SSW im Gehirn menschlicher Feten nachweisbar (Nualart et al., 1999). Vannucci et al. (1994) zeigten übereinstimmend während der postnatalen Gehirnentwicklung der Ratte eine progressive Expression von GLUT3, welche mit der Hirnreifung assoziiert ist. Übereinstimmend mit der Literatur zeigte die immunhistochemische Verteilung von GLUT3 in unseren Untersuchungen eine selektive neuronale Markierung, dem Vorkommen in Neuronen entsprechend (Maher et al., 1992; 1993; 1994).

Auf dem Zusammenspiel von Metabolismus und zerebraler Durchblutung basierend, reflektiert der hier in den nekrosefreien Regionen gezeigte Anstieg von der GLUT1-IR einen gesteigerten Glukosetransport in das Gehirn und der Anstieg von der GLUT3-IR in die Neurone, da die Diffusionsrate von Glukose durch die Anzahl der vorhandenen Transportproteine reguliert ist (Vannucci et

al., 1996). Nahe liegend ist die Aufregulation der Glukosetransportproteine in der Reperfusionsphase, da die Zeit der Asphyxie dafür zu kurz ist. Die bei neonatalen Ratten nachgewiesene hypoxische Aufregulation der GLUT1- und GLUT3-Expression bestand bei GLUT1 noch 72 h nach dem Ereignis fort, während bei der GLUT3-Expression bereits wieder ein Verlust beschrieben wurde, der mit einem neuronalen Zelltod korrelierte (Vannucci et al., 1996). Auch bei adulten Ratten war ein Verlust der GLUT3-IR mit dem verzögerten Zelltod hippocampaler Pyramidenzellen nach globaler Ischämie assoziiert (McCall et al., 1995). Es kann nicht geklärt werden, ob der Abfall der GLUT3-IR einfach Ausdruck des selektiven neuronalen Zelltodes ist oder diesem vorangeht. Die Gehirnschädigung nach fetaler Asphyxie ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, wie z.B. dem Grad und der Dauer der Ischämie oder dem Gestationsalter. Inwieweit die Aufregulation von GLUT1 und GLUT3 als neuroprotektive Mechanismen das Gehirn effektiv während der Reperfusion schützen können, ergibt sich aus einem komplizierten Wechselspiel dieser Faktoren. Offensichtlich reicht der Anstieg von GLUT1 und GLUT3 in den vulnerablen Gehirnregionen zur Neuroprotektion (Lin et al., 2000) nicht aus, wie in vorliegender Arbeit für den parasagittalen Kortex und hippocampale Strukturen gezeigt wurde.

Eine Hypoxie erhöht die Expression sogenannter Hypoxie-induzierbarer-Faktoren (HIF). Dies sind die Transkriptionsfaktoren HIF-1 in kultivierten Neuronen (Ruscher et al., 1998) und HIF-1 und HIF-3 im Rattengehirn (Wiener et al., 1996; Heidbreder et al., 2003). Die Aktivierung von HIF gilt als Schlüsselfaktor für die Regulation der hypoxie-abhängigen Genexpression in den Zellen von Säugetieren (Semenza, 2000). Auch der Glukosetransport (Semenza, 2000) und die Genexpression von BHS-GLUT1 (Jones & Bergeron, 2001; Heidbreder et al., 2003) und GLUT3 im fetalen Gehirn (Royer et al., 2000) werden möglicherweise durch HIF reguliert.

Im Gegensatz zum adulten Gehirn korreliert der fetale ischämische Gehirnschaden mit einem Substratmangel (Chao et al., 1989; Vannucci & Mulsce, 1992), weil der limitierende Faktor für das unreife Gehirn eher einen Substrat- als einen Sauerstoffmangel darstellt (Yager & Thornhill, 1997). Ein Anstieg von der GLUT1- und GLUT3-IR nach Asphyxie reflektiert somit sehr

wahrscheinlich einen steigenden Bedarf nach metabolischen Substraten (Vannucci et al., 1996). Überdies stützten verschiedene experimentelle Studien die Sicht auf die Regulation von Substrattransportern in der BHS als einen einzigartigen adaptiven Mechanismus in der Gehirnentwicklung gegenüber Veränderungen des verfügbaren Substrats (Vannucci et al., 2003). Diese Hochregulation der Glukosetransportproteine im Gehirn ist somit möglicherweise ein adaptiver und neuroprotektiver Mechanismus gegenüber den post-hypoxischen Veränderungen (Vannucci et al., 1996), der offensichtlich, wie unsere Ergebnisse zeigen, bereits im fetalen Gehirn greift. Diese Aufregulation müßte im fetalen Gehirn ausgeprägter als im adulten Gehirn sein, denn im adulten Gehirn spielt der Substratmangel eine untergeordnete Rolle. Schon im normoxischen Gehirn ist bei der neonatalen Ratte der GLUT-Spiegel 2-fach höher als bei der adulten Ratte (Matsumoto et al., 1995)

Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der asphyxiebedingten GLUT-Regulation im Gehirn reifer Schaffeten fehlen bisher. Der post-ischämische Anstieg der GLUT1-IR im Gehirn neonataler Ratten wurde 4 h nach dem Ereignis beobachtet und hielt 72 h bis zum Ende der Beobachtungen an (Vannucci et al., 1996). Der Anstieg der GLUT3-IR wurde dagegen 8 h nach der Hypoxie – Ischämie beobachtet. In Korrelation zum Zelltod zeigte sich nach 72 h ein totaler Verlust des GLUT3-Proteins (Vannucci et al., 1996; McCall et al., 1995). Das Alter der von Vannucci et al. (1996) untersuchten neonatalen Ratten entspricht etwa 0,7 der Trächtigkeitsdauer beim Schaf (Dobbing & Sands, 1979). Bei ebenso alten neonatalen Ratten finden Jones und Bergeron (2002) dagegen unter hypoxischen Bedingungen (8 % O₂) bereits nach 30 Minuten eine Steigerung der Genexpression und 12 h später eine Aufregulation der dazugehörigen Proteine.

Auf der anderen Seite zeigten Nakai et al. (2002) postmortem einen Abfall der GLUT1-IR in den hypoxischen Läsionen bei Kindern mit periventrikulärer Leukomalazie, einer typischen Form des ischämischen Hirnschadens im unreifen Feten (Towbin, 1998). Ein wichtiger Grund für die widersprüchlichen Ergebnisse dieser und unserer Studie könnten im späten Untersuchungszeitraum nach dem schon Monate vorher stattgehabten

hypoxisch–ischämischen Ereignis begründet sein, denn in Regionen, die durch eine Hypoxie geschädigt sind, findet ein gliöser Umbau statt (Towbin, 1998; Nakai et al., 2002).

5.2.4 Effekte von Betamethason auf eine perinatale Asphyxie

5.2.4.1 Betamethasoneffekt auf die zerebrale Hirnschädigung

Diese Studie konnte zeigen, dass es nach einer intrauterinen Asphyxie bei fetalen Schafen unter einer pränatalen Betamethasonbehandlung zu einer deutlichen Zunahme der Gehirnschädigung in Form von neuronalen Nekrosen im parasagittalen Kortex und im Hippokampus kommt. Diese Schäden könnten zu kognitiven Defiziten beitragen, die bei Frühgeborenen nach einer wiederholten, pränatalen Glukokortikoidgabe bereits beobachtet wurden (Esplin et al., 2000).

Es ist bekannt, dass Glukokortikoide eine neuronale Zellschädigung insbesondere im Zusammenhang mit akuten hypoxisch-ischämischen Insulten verstärkt (Roy & Sapolsky, 2003; Sapolsky & Pulsinelli, 1985; Koide et al., 1986). Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass Glukokortikoide die Vulnerabilität der Neurone (Sapolsky, 1994) und der Glia (Tombaugh et al., 1992) gegenüber einem hypoxisch-ischämischen Ereignis erhöhen. Eine die hypoxisch-ischämische Hirnschädigung verstärkende Wirkung von Glukokortikoiden wurde auch bei neonatalen Ratten (Carlos et al., 1991; Kauffman et al., 1994; Sapolsky & Pulsinelli, 1985) gezeigt. Kontrovers zeigt Dexamethason ($0,01 - 0,5 \text{ mg kg}^{-1}\text{d}^{-1}$) an neonatalen Ratten auch einen protektiven Effekt gegenüber einer Ischämie (Liu et al., 1995; Tuor et al., 1995). Die Neuroprotektion durch Dexamethason scheint auf den verzögerten Abbau von Hochenergiephosphaten wie ATP und Glukose zurückzuführen zu sein (Tuor et al., 1997). Neuroprotektiv könnten Glukokortikoide auch durch die Verminderung der lokalen Glukoseutilisation wirken, wie an neonatalen Ratten unter normoxischen Bedingungen gezeigt wurde (Tuor et al., 1997). Dieser protektive Glukokortikoideffekt scheint aber an eine bestimmte Phase des sich entwickelnden Gehirns gebunden zu sein, denn er ist bei Ratten am 7. Tag postnatal, jedoch nicht mehr 1 Monat postnatal, wenn die Myelinisierung und

Synaptogenese abgeschlossen sind, nachweisbar (Tuor et al., 1995). Diese glukokortikoidbedingte neuroprotektive Phase wäre bei den Versuchstieren unserer Studie bereits abgeschlossen, denn der 7. Tag postnatal bei der Ratte entspricht bezüglich der Hirnentwicklung etwa 0,7 der Trächtigkeitsdauer beim Schaf (Dobbing & Sands, 1979; Morgane et al., 1993; Gramsbergen, 1998; Romijn et al., 1991). Wir konnten in eigenen Studien zeigen, dass Betamethason in einer niedrig verwendeten Dosis ($0,085 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$) die oxidative Phosphorylierung in den Atmungsketten hemmt (Schwab et al., 2006). Diese führt aber interessanterweise nicht zu einem verminderten Angebot energiereicher Phosphate, was auf einen noch stärker verminderten Bedarf an energiereichen Phosphaten als Ausdruck der katabolen Stoffwechseleffekte schließen lässt. Die oxidative Phosphorylierung spielt allerdings in einer Hypoxie eine geringe Rolle, deshalb unterstützt der verminderte Stoffwechsel eher die von Tuor et al. (1997) beschriebenen protektiven Effekte.

Die Verteilung von Mineralo – und Glukokortikoidrezeptoren spielt eine wesentliche Rolle für die Wirkung von Kortikoiden, wie insbesondere für die hippokampale Formation gezeigt wurde (Uno et al., 1994; Hassan et al., 1996). Bei steigenden Steroidkonzentrationen kommt es bei den natürlichen vorkommenden Kortikoiden wie Kortisol im Hippokampus nach Sättigung der Mineralokortikoidrezeptoren zu einer verstärkten Bindung an Glukokortikoidrezeptoren, die normalerweise nicht voll besetzt sind. Niedrige Kortisolspiegel, bei denen hauptsächlich Mineralokortikoidrezeptoren gesättigt sind, haben eher einen neuroprotektiven Effekt, währenddessen hohe Kortisolspiegel über eine Aktivierung der Glukokortikoidrezeptoren neurotoxische und Apoptose induzierende Wirkungen ausüben (Hassan et al. 1996). Es ist bekannt, dass insbesondere die hippokampalen Pyramidenzellen der CA3-Region im sich entwickelnden Primatengehirn (0,81 der Gestationsdauer) vulnerabel auf die Exposition von exogenen Glukokortikoiden reagieren (Uno et al., 1994). So induzieren antenatale Glukokortikoide, wie Betamethason, eine Verminderung der Neuronenzahl im adulten Primatengehirn begleitet von einer Degeneration der Dendriten hippokampaler Neurone, die bereits im fetalen, aber auch im adulten Gehirn bei Ratten und Primaten nachgewiesen wurde (Sapolsky et al., 1990; Scully & Otten, 1995;

Uno et al., 1994). Zudem binden sie selektiv an Glukokortikoidrezeptoren und haben zu diesen eine etwa 10 -fach höhere Affinität als Kortisol (Reul et al., 1985). Da Glukokortikoidrezeptoren ubiquitär im gesamten Gehirn vorhanden sind (Ahima & Harlan, 1990; Cintra et al., 1994), könnten die hohe Affinität und die spezifische Aktivierung von Glukokortikoidrezeptoren für die verstärkte Schädigung der Neurone unter Betamethason verantwortlich sein.

Für die verstärkte neuronale Schädigung unter Betamethason können weitere Zusammenhänge diskutiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Glukokortikoide die extrazelluläre Konzentration exzitatorischer Aminosäuren erhöhen (McEwen, 1994; Supko & Johnston, 1994). Möglicherweise liegt dies in einer Hemmung der Glutamataufnahme durch die Gliazellen begründet (Virgin et al., 1991). Folglich bewirkt der Anstieg des freien zytosolischen Ca^{2+} eine Aktivierung von Proteasen, Endonukleasen sowie durch die Freisetzung freier O_2 -Radikale typische Schäden des ZNS (Reagan & McEwen, 1997). Weiterhin wird für das adulte Gehirn diskutiert, ob eine glukokortikoid-bedingte Verminderung der Glukoseaufnahme in die Zelle während einer Hypoxie die neuronale Zellschädigung verstärkt (Sapolsky & Pulsinelli, 1985). Diese glukokortikoidbedingte verminderte Glukoseutilisation könnte zum vorzeitigen Auftreten von ischämischen Depolarisationen führen (Adachi et al., 1998), welche wiederum eine Verstärkung der neuronalen Schädigung bedingt. Gleichzeitig führen Glukokortikoide zu einer Glukosefreisetzung *in vivo*.

Ein weiterer Mechanismus könnte die glukokortikoidbedingte Verschiebung der unteren und oberen Autoregulationsgrenze hin zu höheren Blutdruckwerten sein, den unsere Arbeitsgruppe in parallelen Studien am fetalen Schaf zeigen konnte (Löhle, 2003). Ursache dafür ist ein erhöhter zerebraler Vasotonus (Schwab et al., 2000) aufgrund einer Änderung der Empfindlichkeit der fetalen Gefäße gegenüber vasoaktiven Mediatoren (Anwar et al., 1999, Molnar et al., 2002). Die glukokortikoidbedingte Verschiebung der oberen Autoregulationsgrenze schützt vermutlich vor allem während hypertoner Blutdruckphasen, wie sie im Rahmen einer post-asphyktischen Hyperperfusion vorkommen, das unreife Gehirn vor intraventrikulären Blutungen, welche auch nicht beobachtet werden konnten. Andererseits muß aufgrund der gleichzeitigen Senkung der Hirndurchblutung und der Verschiebung der unteren

Autoregulationsgrenze davon ausgegangen werden, dass es bei einem Blutdruckabfall, z.B. während einer perinatalen Asphyxie, zu einer verstärkten Abnahme der Hirndurchblutung und einer Einschränkung des O₂-Angebotes im fetalen Gehirn kommt und somit das Ausmaß selektiver neuronaler Zelluntergänge verstärkt wird. Die maximale Vasodilatation wird aufgrund der Hemmung der Nitritoxidsynthetase (NOS), einem wichtigen Vasodilatator der fetalen Zirkulation, verhindert (Molnar et al., 2002). Betamethason vermindert außerdem die sekundäre Hyperperfusion, was zu einer unzureichenden post-asphyktischen Energiebereitstellung führen und damit den Reperfusionsschaden verstärken könnte (Müller et al., 2006). Zudem ist unter hypoxischen Bedingungen eine Abnahme des protektiven Effektes einer CO₂-Erhöhung gegenüber hypoxisch-ischämischen Hirnschäden (Vannucci et al., 1995) zu befürchten, da durch Glukokortikoide auch die Vasodilatationskapazität der Hirngefäße eingeschränkt ist.

5.2.4.2 *Betamethasoneffekt auf GLUT1 und GLUT3*

Im Gegensatz zu unserer Hypothese, dass die Glukoseaufnahme in die Zelle durch eine glukokortikoidbedingte Hemmung der Glukosetransporter vermindert ist und damit die verminderte Glukoseaufnahme in die Neurone und die Glia erklärt werden kann, die in der Zellkultur unter Dexamethasongabe gezeigt worden ist (Virgin et al., 1991; Horner et al., 1990), bewirkt Betamethason keine verminderte Expression von GLUT1 und GLUT3, überdies sogar eine gesteigerte Expression von GLUT1.

Die glukokortikoidbedingte verstärkte Expression von GLUT1 nach Asphyxie könnte den Glukosetransport über die BHS ins fetale Gehirn verbessern. Der somit verbesserte Glukosetransport scheint jedoch für die vulnerablen Regionen (parasagittaler Kortex und im Hippokampus) ohne sichtbaren protektiven Effekt gegenüber dem neuronalen Zelltod zu bleiben.

Anders für die nekrosefreien Regionen. Hier scheint sich der Anstieg der GLUT1 durch die Gabe von Betamethason positiv auszuwirken, wie an dem verminderten Verlust der Zytoskelettproteine MAP1B und MAP2 unter der Gabe von Betamethason deutlich wird. Diese ischämie-empfindlichen Proteine reagieren unter der Gabe von Betamethason offensichtlich weniger vulnerabel

auf die Asphyxie, möglicherweise tatsächlich, weil in den nicht-nekrotischen Regionen die verstärkte Substratzufuhr ausreicht, um den durch Asphyxie ausgelösten Schaden zu begrenzen. Es ist bekannt, dass die Glukoseversorgung unter den Bedingungen einer Asphyxie entscheidend die hypoxisch-ischämische Schädigung des fetalen Gehirns verbessert (Yager und Thornhill, 1997).

Der glukokortikoidbedingte verstärkte post-asphyktische Anstieg von GLUT1 könnte zu den protektiven Glukokortikoideffekten während einer Hypoxie-Ischämie bei neonatalen Ratten (Tuor et al., 1997) und nach neurotoxischer Schädigung durch intrazerebrale Injektion von Ibotensäure an neonatalen Mäusen (Arquie et al., 2002) beitragen. Der von Tuor et al. (1997) gezeigte, während einer neonatalen Hypoxie erhaltene zerebrale ATP-Gehalt besteht möglicherweise teilweise aufgrund der Hochregulation von GLUT1. Dieser Zusammenhang bedarf jedoch weiterer Klärung, da Betamethason die Atmungskette hemmt (siehe oben) und deshalb theoretisch nur ein eingeschränkter Glukosebedarf besteht.

GLUT1 wird durch Betamethason in den nekrotischen Regionen nicht aufreguliert, wahrscheinlich deshalb, weil dort kein Bedarf mehr besteht. Eine bedarfsabhängige Hochregulation von GLUT1 über das normale Maß würde einen erhöhten Stoffwechsel unter Betamethason voraussetzen, dies stünde jedoch auch im Widerspruch zu den katabolen Effekten von Glukokortikoiden. Betamethason scheint, anders als bei neonatalen Ratten (Tuor et al., 1997), im vorliegenden Asphyxiemodell nicht vor neuronaler Nekrose zu schützen (siehe 5.3.1). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die neuronale GLUT3-Expression nach der Gabe von Betamethason unverändert bleibt. Möglicherweise limitiert dies den Glukosetransport durch die neuronale Membran. Andererseits übersteigt die Affinität von GLUT3 zu Glukose die von GLUT1 (Maher et al., 1994), was möglicherweise eine höhere Transportkapazität von GLUT3 ermöglicht und somit der neuronalen Schädigung wirksam entgegentreten könnte.

5.2.4.3 *Betamethasoneffekt auf MAP1B und MAP2*

Die zur Quantifizierung der neuronalen Schädigung untersuchten Zytoskelettproteine MAP1B und MAP2 ließen in den Gebieten neuronaler Nekrosen (parasagittaler Kortex, Hippokampus) unter der Gabe von Betamethason eine Immunmarkierung vermissen. Hier wird eine vollständige Zerstörung des Zytoskeletts angenommen. Die Aufregulation der GLUT1-IR hat hier keinen protektiven Effekt.

In den untersuchten nekrosefreien Regionen (frontaler Neokortex, Hippokampus, Striatum) war der asphyxiebedingte Verlust von der MAP1B- und der MAP2- IR nach der Gabe von Betamethason vermindert. Es stellt sich die Frage, ob dies auf einem verzögerten Abbau oder einer verstärkten Synthese der Proteine beruht. Eine verstärkte Synthese erscheint unwahrscheinlich, da Betamethason schon unter normoxischen Bedingungen einen akuten Verlust von MAP1B und MAP2 bewirkt (Schwab et al., 2001; Antonow-Schlorke et al., 2003). Um die Theorie des verzögerten Abbaus von MAP zu prüfen, müssten weitere Messungen zu früheren und späteren Zeitpunkten erfolgen.

Als eine Möglichkeit könnte der verminderte Verlust von MAP1B und MAP2 auch als neuroprotektive Wirkung von Betamethason interpretiert werden, die möglicherweise durch den glukokortikoidbedingten Anstieg von GLUT1 (siehe oben) induziert wurde. Mit einer weiterführenden Messung von MAP1B und MAP2 unter der Hemmung der Glukosetransporter, könnte dieser Zusammenhang überprüft werden.

5.2.4.4 *Betamethasoneffekt auf Synaptophysin*

Das Strukturprotein Synaptophysin war in den Gebieten neuronaler Nekrosen ebenfalls nicht nachweisbar. Wie auch bei den Zytoskelettproteinen MAP1B und MAP2 konnte die Aufregulation von der GLUT1-IR unter Betamethason scheinbar nicht vor einem vollständigen Verlust der Synaptophysin-IR schützen.

Der Verlust der Synaptophysin-IR in den nekrosefreien Regionen nach Asphyxie blieb im Gegensatz zum verminderten MAP-Verlust unter Betamethason jedoch unverändert. Die Ergebnisdifferenz liegt möglicherweise

darin begründet, dass Synaptophysin im Gegensatz zu MAP kein high turn over Protein ist (Daly & Ziff, 1997).

6 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Untersuchung wurde anhand chronisch instrumentierter Schaffeten der Einfluß einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf eine perinatale Hirnschädigung untersucht.

Das wie auch im reifen menschlichen Feten typische Muster einer zerebralen Hirnschädigung mit neuronalen Nekrosen im parasagittalen Kortex und im Hippokampus ließ sich durch intrauterine Asphyxie am reifen fetalen Schaf reproduzieren. Begleitet war diese Schädigung von einem Verlust der neuronalen Zytoskelettproteine MAP1B und MAP2 sowie des Strukturproteins Synaptophysin als Ausdruck einer neuronalen Funktionsstörung. Zudem zeigte sich eine Hochregulation der Glukosetransportproteine GLUT1 und GLUT3 nach Asphyxie, die für den Glukosetransport über die Bluthirnschranke und über die Membranen der Neuronen verantwortlich sind. Untersuchungen zur Regulation von GLUT1 und GLUT3 unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen *in utero* sind bisher nicht beschrieben. Offensichtlich reicht der Anstieg von GLUT1 und GLUT3 in den vulnerablen Gehirnregionen zur Neuroprotektion nicht aus, wie in vorliegender Arbeit für den parasagittalen Kortex und hippokampale Strukturen gezeigt wurde. Da die Messungen 24 h nach den Nabelschnurokklusionen erfolgten, können wir nicht zwischen primärer Zellschädigung während der Nabelschnurokklusionen und sekundärer Zellschädigung durch die Reperfusion differenzieren. Ebenso kann nicht geklärt werden, ob die Regulierung von GLUT dem selektiven neuronalen Zelltod vorangeht oder umgekehrt. Dafür sind weiterführende Untersuchungen zum Zeitgang der Reperfusion notwendig.

Eine Betamethasonbehandlung in der klinisch zur Beschleunigung der Lungenreifung bei menschlichen Feten verwendeten Dosierung ist beim Schaffetus mit einer deutlichen Verstärkung des selektiven neuronalen Zelluntergangs in den gegenüber einer Asphyxie vulnerablen Regionen des parasagittalen Kortex und des Hippokampus verbunden. Diese Schäden können zu kognitiven Defiziten beitragen, die bei Frühgeborenen nach einer wiederholten, pränatalen Glukokortikoidgabe bereits beobachtet wurden (Esplin

et al., 2000). Ferner kommt es unter Betamethason zu einer verstärkten post-asphyktischen Hochregulation von GLUT1, nicht jedoch von GLUT3 24 h nach der Asphyxie. Die verbesserte Glukosebereitstellung führt jedoch nicht zu einem protektiven Effekt in den vulnerablen Regionen (parasagittaler Kortex und im Hippokampus) gegenüber der Asphyxie.

Anders als in den Gebieten mit einem selektiven neuronalen Zelltod scheint sich die Gabe von Betamethason in den nekrorefreien Regionen positiv auszuwirken, wie in einem verminderten Verlust der Zytoskettproteine MAP1B und MAP2 unter der Gabe von Betamethason deutlich wird. Möglicherweise wird die protektive Wirkung durch den glukokortikoidbedingten Anstieg von GLUT1 induziert. Mit einer weiterführenden Messung von MAP1B und MAP2 unter der Hemmung der Glukosetransporter, könnte dieser Zusammenhang überprüft werden. Betamethason blieb ohne Auswirkung auf den post-asphyktischen Verlust von Synaptophysin.

Die Ergebnisse legen nahe, dass die klinisch genutzte Glukokortikoiddosis zu einer erhöhten Vulnerabilität des fetalen Gehirns gegenüber metabolischen Insulten wie einer perinatalen Asphyxie führt, aber auch einen neuroprotektiven Effekt in Regionen hat, die von der Schädigung nicht primär betroffen sind. Die Untersuchungen sollen dazu beitragen, die Entscheidung in der Praxis zu einer antenatalen Glukokortikoidgabe unter Berücksichtigung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses streng abzuwägen.

7 Literaturverzeichnis

Adachi N, Chen J, Liu K, Tsubota S, Arai T (1998). Dexamethasone aggravates ischemia-induced neuronal damage by facilitating the onset of anoxic depolarization and the increase in the intracellular Ca^{2+} concentration in gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab.* 18(3):274-80.

Ahima R, Krozowski Z, Harlan R (1991). Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids. *J Comp Neurol.* 313(3):522-38.

Ahima RS, Harlan RE (1990). Carting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience* 39: 579-604.

Anderson MS, Flowers-Ziegler J, Das UG, Hay WW Jr, Devaskar SU (2001). Glucose transporter protein responses to selective hyperglycemia or hyperinsulinemia in fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 281(5):R1545-52.

Antonow-Schlorke I, Kühn B, Müller T, Schubert H, Nathanielsz PW, Walter B, Schwab M (2000). Effect of betamethasone treatment on microtubule association proteins MAP2 and MAP1B and myelinisation in fetal sheep. *J Soc Gynecol Invest* 7 (Suppl.): 109.

Antonow-Schlorke I, Müller T, Schubert H, Wicher C, Schwab M (2002). Betamethasone related acute alterations of brain microtubule associated proteins in the fetal sheep brain are independent of baseline plasma cortisol level. *Cesk Gynecol* 67(Suppl. 3): 3.

Antonow-Schlorke I, Schwab M, Li C, Nathanielsz PW (2003). Glucocorticoid exposure at the dose used clinically alters cytoskeletal proteins and presynaptic terminals in the fetal baboon brain. *J Physiol* 547(Pt 1): 117-23.

Antonow-Schlorke I, Herrmann A, Müller T, Anwar MA, Schubert H, Witte O, Schwab M (2003). Betamethasone (BM) exposure increases hippocampal neuronal necrosis after repeated umbilical cord occlusion (UCO) in fetal sheep.

in *28th Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society*. Banff, Canada.

Anwar MA, Schwab M, Poston L, Nathanielsz PW (1999). Betamethasone-mediated vascular dysfunction and changes in hematological profile in the ovine fetus. *Am J Physiol* 276(4 Pt 2): H1137-43.

Arnold SE & Trojanowski JQ (1996). Human fetal hippocampal development: II. The neuronal cytoskeleton. *J Comp Neurol* 367(2): 293-307.

Astrom KE (1967). On the early development of the isocortex in fetal sheep. *Prog Brain Res* 26: 1-59.

Ballabh P, Lo ES, Kumari J, Cooper TB, Zervoudakis I, Auld PA, Krauss AN (2001). Pharmacokinetics of betamethasone in twin and singleton pregnancy. *Clin Pharmacol Ther* 71: 39-45.

Ballard PL, Granberg P & Ballard RA (1975). Glucocorticoid levels in maternal and cord serum after prenatal betamethasone therapy to prevent respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 56: 1548-1554.

Barkovich AJ, Gressens P, Evrard P (1992). Formation, maturation, and disorders of brain neocortex. *AJNR Am J Neuroradiol.* 13(2):423-46. Review.

Barrington KJ (2001). The adverse neuro-developmental effects of postnatal steroids in the preterm infant: a systematic review of RCTs. *BMC Pediatr* 1:1.

Berger R, Garnier Y (1999). Pathophysiology of perinatal brain damage. *Brain Res Rev* 30:107-34.

Berger R, Garnier Y, Jensen A (2002). Perinatal brain damage: underlying mechanisms and neuroprotective strategies. *J Soc Gynecol Investig*;9(6):319-28. Review.

Blomgren K, McRae A, Bona E, Saido TC, Karlsson JO, Hagberg H (1995). Degradation of fodrin and MAP 2 after neonatal cerebral hypoxic-ischemia. *Brain Res* 684(2): 136-42.

Bocking AD. (1993). The relationship between heart rate and asphyxia in the animal fetus. *Clin Invest Med.* 16(2):166-75. Review.

- Bondy CA, Lee W, Zhou J.** (1992). Ontogeny and cellular distribution of brain Glukose transporter gene expression. *Mol Cell Neurosci* 3: 305-314.
- Borski RJ.** (2000). Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. *Trends Endocrinol Metab.* 11(10):427-36. Review.
- Brodhun M, Coksaygan T, Antonow-Schlorke I, Müller T, Schubert H, Patt S, Nathanielsz PW, Schwab M** (2003). Acute effects of antenatal betamethasone treatment on apoptosis and glucocorticoid receptor density in fetal sheep brain. *J Soc Gynecol Invest* 10 :710.
- Brodhun M, Coksaygan T, Müller T, Antonow-Schlorke I, Schubert H, Patt S, Nathanielsz PW, Schwab M** (2004). Time and dose dependent effects of antenatal glucocorticoids on cell birth and death in the fetal sheep brain. *J Soc Gynecol Invest* 11 (Supl.): 533.
- Cambray-Deakin MA, Burgoyne RD.** (1990). Regulation of neurite outgrowth from cerebellar granule cells in culture: NMDA receptors and protein kinase C. *Adv Exp Med Biol* 268:245-53.
- Cammermeyer J.** (1962). An evaluation of the significance of the “dark” neuron. *Ergebn. Anat. Entwickl. – Gesch.* 36: 1-61.
- Carlos RQ, Seidler FJ, Slotkin TA** (1991). Fetal dexamethasone exposure sensitizes neonatal rat brain to hypoxia: effects on protein and DNA synthesis. *Dev Brain Res* 64:161-166.
- Castillo-Melendez M, Chow JA, Walker DW** (2004). Lipid peroxidation, caspase-3 immunoreactivity, and pyknosis in late-gestation fetal sheep brain after umbilical cord occlusion. *Pediatr Res.* 55(5):864-71.
- Celsi G, Kistner A, Aizman R, Eklof AC, Ceccatelli S, de Santiago A, Jacobson SH** (1998). Prenatal dexamethasone causes oligonephronia, sodium retention, and higher blood pressure in the offspring. *Pediatr Res* 44(3): 317-22.
- Chao CR, Hohimer AR, Bissonnette JM** (1989). The effect of elevated blood glucose on the electroencephalogram and cerebral metabolism during short-term brain ischemia in fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol* 161:221-228.

- Cintra A, Zoli M, Rose L.** (1994). Mapping and computer assisted morphometry and microdensitometry of glucocorticoids receptor immunoreactive neurons and glial cells in the rat central nervous system. *Neuroscience* 62: 843-897.
- Colberg C, Antonow-Schlorke I, Muller T, Schubert H, Witte OW, Schwab M.** (2004). Recovery of glucocorticoid-related loss of synaptic density in the fetal sheep brain at 0.75 of gestation. *Neurosci Lett.* 364(2):130-4.
- Colbran RJ, Bass MA, McNeill RB, Bollen M, Zhao S, Wadzinski BE, Strack S.** (1997). Association of brain protein phosphatase 1 with cytoskeletal targeting/regulatory subunits. *J Neurochem.* 69(3):920-9.
- De Kloet ER, Rosenfeld P, Van Eekelen JA, Sutanto W, Levine S.** (1988). Stress, glucocorticoids and development. *Prog Brain Res* 73. 101-120.
- Derks JB, Mulder EJ, Visser GH.** (1995). The effects of maternal betamethasone administration on the Fetus. *Br J Obstet Gynaecol* 102(1): 40-6.
- Derks JB, Giussani DA, Jenkins SL, Wentworth RA, Visser GH, Padbury JF, Nathanielsz PW** (1997). A comparative study of cardiovascular, endocrine and behavioural effects of betamethasone and dexamethasone administration to fetal sheep. *J Physiol Lond* 499(Pt 1): 217-26.
- Demarini S, Dollberg S, Hoath SB, Ho M, Donovan EF** (1999). Effects of antenatal corticosteroids on blood pressure in very low birth weight infants during the first 24 hours of life. *J Perinatol* 19(6): 419-25.
- Dewar D & Dawson DA** (1997). Changes of cytoskeletal protein immunostaining in myelinated fibre tracts after focal cerebral ischaemia in the rat. *Acta Neuropathol* 93:71-77
- Dick APK, Harik SI, Klip A, Walker DM.** (1984). Identification and characterization of the Glucose transporter of the blood-brain barrier by cytochalasin B binding and immunological reactivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 7233-7237.
- Distelhorst CW** (2002). Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 9:6-19.

- Dobbing J, Sands J.** (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*: 3: 79-83.
- Dodic M, May CN, Wintour EM, Coghlan JP** (1998). An early prenatal exposure to excess glucocorticoid leads to hypertensive offspring in sheep. *Clin Sci* 94 (2): 149-155.
- Doyle P, Guillaume Gentil C, Rohner Jeanrenaud F, Jeanrenaud B.** (1994). Effects of corticosterone administration on local cerebral Glukose utilization of rats. *Brain Res* 645(1-2): 225-30.
- Elimian A, Verma U, Canterino J, Shah J, Visintainer P, Tejani N.** (1999). Effectiveness of antenatal steroids in obstetric subgroups. *Obstet Gynecol.* 93:174-9.
- Endo Y, Nishimura J, Kimura F** (1994). Adrenalectomy increases local cerebral blood flow in the rat hippocampus. *Pflugers Arch* 426(3-4): 183-8.
- Endo Y, Nishimura JI, Kobayashi S, Kimura F** (1997). Long-term glucocorticoid treatments decrease local cerebral blood flow in the rat hippocampus, in association with histological damage. *Neuroscience* 79(3): 745-52.
- Esplin MS, Fausett MB, Smith S, Oshiro BT, Porter TF, Branch DW, Varner MW** (2000). Multiple courses of antenatal steroids are associated with a delay in long-term psychomotor development in children with birth weights < 1,500 grams. *Am J Obstet Gynecol* 182: S24.
- Evans RM, Hollenberg SM.** (1988). Cooperative and positional independent trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 53 (2):813-8.
- Falkowski A, Hammond R, Han V, Richardson B.** (2002). Apoptosis in the preterm and near term ovine fetal brain and the effect of intermittent umbilical cord occlusion. *Brain Res Dev Brain Res.* 136(2):165-73.
- Fellman V, Raivio KO** (1996). Reperfusion injury as the mechanism of brain damage after perinatal asphyxia. *Pediatric Research* 41: 599-606

- Ferreira A, Busciglio J, Caceres A.** (1989). Microtubule formation and neurite growth in cerebellar macroneurons which develop in vitro: evidence for the involvement of the microtubule-associated proteins, MAP-1a, HMW-MAP2 and Tau. *Brain Res Dev Brain Res.* 49(2):215-28.
- Fields HM, Rinaman L, Devaskar SU.** (1999). Distribution of Glukose transporter isoform-3 and hexokinase I in the postnatal murine brain. *Brain Res* 846: 260-264.
- Freitas JE, Sarosi MG, Nagle CC, Yeomans ME, Freitas AE, Juni JE.** (1995). Modified PLOPED criteria used in clinical practice. *J Nucl Med.* 36(9):1573-8.
- Fujii EY, Takahashi N, Kodama Y, Roman C, Ferriero DM, Parer JT.** (2003). Hemodynamic changes during complete umbilical cord occlusion in fetal sheep related to hippocampal neuronal damage. *Am J Obstet Gynecol.* 188(2):413-8.
- Gerhart DZ, LeVasseur RJ, Broderius MA, Drewes LR.** (1989). Glukose transport localization in brain using light and electron immunocytochemistry. *J Neurosci Res* 22: 464-472.
- Gerhart DZ, Leino RL, Taylor WE, Borson ND, Drewes LR.** (1994). GLUT1 and GLUT3 gene expression in gerbil brain following brief ischemia: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res.* 25(3-4):313-22.
- Gordon-Weeks PR.** (1991). Control of microtubule assembly in growth cones. *J Cell Sci Suppl.* 15:45-9. Review.
- Gramsbergen A, Mulder EJ.** (1998). The influence of betamethasone and dexamethasone on motor development in young rats. *Pediatr Res.* Jul;44(1):105-10.
- Grunnet ML.** (1995). A lectin and synaptophysin study of developing brain. *Pediatr Neurol.* 13(2):157-60.
- Gschanes A, Boado R, Sametz W, Windisch M.** (2000). The drug cerebrolysin and its peptide fraction E021 increase the abundance of the blood-brain barrier GLUT1 glucose transporter in brains of young and old rats. *Histochem J.* 32(2):71-7.
- Guzzetta F** (1991). Ischemic and hemorrhagic cerebral lesions of the newborn.

Child's Nervous System, 7: 417-424.

Hall ED (1993). Neuroprotective actions of glucocorticoid and nonglucocorticoid steroids in acute neuronal injury. *Cell Mol Neurobiol.* 13(4):415-32. Review.

Hanson MA (1988). The importance of baro- and chemoreflexes in the control of the fetal cardiovascular system. *J Dev Physiol.* 10, 491-511.

Harik SI, Behmand RA, LaManna JC (1994). Hypoxia increases glucose transport at blood-brain barrier in rats. *J Appl Physiol.* 77(2):896-901.

Hassan AH, von Rosenstiel P, Patchev VK, Holsboer F, Almeida OF (1996). Exacerbation of apoptosis in the dentata gyrus of the aged rat by dexamethason an the protective role of corticosterone. *Exp Neurol* 140: 43-52.

Heidbreder M, Frohlich F, Jhren O, Dendorfer A, Qadri F, Dominiak P (2003). Hypoxia rapidly activates HIF-3alpha mRNA expression. *FASEB J.* 17(11):1541-3. Epub 2003 Jun 3.

Horner HC, Packan DR, Sapolsky RM (1990). Glucocorticoids inhibit glucose transport in cultured hippocampal neurons and glia. *Neuroendocrinology.* Jul;52(1):57-64.

Huang WL, Harper CG, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA (2001). Repeated prenatal corticosteroid administration delays myelination of the corpus callosum in fetal sheep. *Int J Dev Neurosci.* Jul;19(4):415-25.

Iadecola C (1993). Regulation of the cerebral microcirculation during neural activity: is nitric oxide the missing link? *Trends Neurosci* 16(6): 206-14.

Ikedo T, Murata Y, Quilligan EJ, Choi BH, Parer J, Doi S, Park SD (1998). Physiologic and histologic changes in near-term fetal lambs exposed to asphyxia by partial umbilical cord occlusion. *Am J Obstet Gynecol* 178: 24-32.

Jensen A (1996). The brain of the asphyxiated fetus-basic research. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 65, 19-24.

Jensen A and Berger R (1991). Fetal circulatory responses to oxygen lack. *J Dev Physiol.* 16, 181-207.

- Jensen A, Schumacher R** (1987). Intrakranielle Blutungen: Ursache, Diagnostik und Bedeutung. *Gynäkologe*, 20: 52-64.
- Jensen A, Vaihinger HM, Meier C.** (2003). Perinatal brain damage-from neuroprotection to neuroregeneration using cord blood stem cells. *Med Klin (Munich)*. Dec 15;98 Suppl 2:22-6. German.
- Joels M, de Kloet ER.** (1992). Controll of neuronal excitability by corticosteroid hormones. *Trends Neurosci* 15: 25-30.
- Joels M, de Kloet ER.** (1994). Mineralcorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol* 43: 1-36.
- Johnson GV & Jope RS** (1992). The role of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in neuronal growth, plasticity and degeneration. *J Neurosci Res* 33: 505-512.
- Johnson JI, Sudheimer KD, Davis KK, Winn BM.** The navigable Atlas of the sheep brain. www.msu.edu/user/brains/sheepatlas
- Jones NM, Bergeron M.** (2001). Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 21(9):1105-14.
- Kari MA, Hallman M, Eronen M, Teramo K, Virtanen M, Koivisto M, Ikonen RS** (1994). Prenatal dexamethasone treatment in conjunction with rescue therapy of human surfactant: a randomized placebo-controlled multicenter study. *Pediatrics* 93(5): 730-6.
- Kauffman KS, Seidler FJ, Slotkin TA** (1994). Prenatal dexamethasone exposure causes loss of neonatal hypoxia tolerance: cellular mechanisms. *Pediatr Res* 35:515-522.
- Kaufmann W und Löhr GW** (1992). Pathophysiologie. Ein kurzgefaßtes Lehrbuch. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Keunen H, Blanco CE, van Reempts JL, Hasaart TH.** (1997). Absence of neuronal damage after umbilical cord occlusion of 10, 15, and 20 minutes in midgestation fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol.* 176(3):515-20.

- Knaus P, Betz H, Rehm H** (1986). Expression of synaptophysin during postnatal development of the mouse brain. *J Neurochem* 47(4): 1302-4.
- Koide T, Wieloch TW, Siesjo BK** (1986). Chronic dexamethasone pretreatment aggravates ischemic neuronal necrosis. *J Cereb Blood Flow Metab* 6:395-404.
- Kream J, Mulay S, Fukushima DK, Solomon S** (1983). Determination of plasma dexamethasone in the mother and the newborn after administration of the hormone in a clinical trial. *J Clin Endocrinol Metabol* 56: 127-133.
- Landgraf R, Mitro A, Hess J** (1978). Regional net uptake of ¹⁴C-glucose by rat brain under the influence of corticosterone. *Endocrinol Exp* 12:119-129.
- Larroche JC** (1977). Developmental Pathology of the Neonate. New York, Excerpta Medica
- Leclerc N, Beesley PW, Brown I, Colonnier M, Gurd JW, Paladino T, Hawkes R** (1989). Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex. *J Comp Neurol*, 280: 197-212.
- Leviton A, Kuban KC, Pagano M, Allred EN, Van Marter L** (1993). Antenatal corticosteroids appear to reduce the risk of postnatal germinal matrix hemorrhage in intubated low birth weight newborns. *Pediatrics* 91(6): 1083-8.
- Levitt NS, Lindsay RS, Holmes MC, Seckl JR** (1996). Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. *Neuroendocrinology* 64(6): 412-8.
- Liggins GC** (1969). Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J Endocrinol* 45(4): 515-23.
- Liggins GC & Howie RN** (1972). A controlled trial of antepartum glucocorticoid treatment for prevention of the respiratory distress syndrome in premature infants. *Pediatrics* 50(4): 515-25.
- Lin Z, Weinberg JM, Malhotra R, Merritt SE, Holzman LB, Brosius FC 3rd** (2000). GLUT-1 reduces hypoxia-induced apoptosis and JNK pathway activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 278(5):E958-66.

Liu Y, Wada H, Takada S, Uetani Y, Itoh H, Nakamura H (1995). Preventive effects of dexamethasone on hypoxic-ischemic brain damage in the neonatal rat. *Brain Dev.* 17:186-192.

Loehle M, Muller T, Wicher C, Roedel M, Schubert H, Witte OW, Nathanielsz PW, Schwab M (2005). Betamethasone effects on fetal sheep cerebral blood flow are not dependent on maturation of cerebrovascular system and pituitary-adrenal axis. *J Physiol.* 564(Pt 2):575-88

Loike JD, Cao L, Brett J, Ogawa S, Silverstein SC, Stern D (1992). Hypoxia induces glucose transporter expression in endothelial cells. *Am J Physiol.* 263(2 Pt 1):C326-33.

Maher F, Simpson IA (1994). The GLUT3 glucose transporter is the predominant isoform in primary cultured neurons: assessment by biosynthetic and photoaffinity labelling. *Biochem J.* Jul 15;301 (Pt 2):379-84.

Maher F, Vannucci SJ, Takeda J, Simpson IA (1992). Expression of mouse-GLUT3 and human-GLUT3 glucose transporter proteins in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 182: 703-711.

Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA (1993). Glucose transporter isoforms in brain: Absence of GLUT3 from the blood brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 342-345.

Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA (1994) Glucose transporter proteins in brain.

Malinak C & Silverstein FS (1996). Hypoxic-ischemic injury acutely disrupts microtubule-associated protein 2 immunostaining in neonatal rat brain. *Biol Neonate* 69(4): 257-67.

Mallard CE, Gunn AJ, Williams CE, Johnston BM, Gluckman PD (1992). Transient umbilical cord occlusion causes hippocampal damage in the fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol.* 167, 1423-30.

Mallard EC, Williams CE, Johnston BM, Gluckman PD (1994). Increased vulnerability to neuronal damage after umbilical cord occlusion in fetal sheep with advancing gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 170(1 Pt 1):206-14.

- Mallard EC, Williams CE, Gunn AJ, Gunning MI, Gluckman PD** (1993). Frequent episodes of brief ischemia sensitize the fetal sheep brain to neuronal loss and induce striatal injury. *Pediatr Res.* 33(1):61-5.
- Mallard EC, Williams CE, Johnston BM, Gunning MI, Davis S, Gluckman PD** (1995). Repeated episodes of umbilical cord occlusion in fetal sheep lead to preferential damage to the striatum and sensitize the heart to further insults. *Pediatr Res.* 37(6):707-13.
- Mallard C, Welin AK, Peebles D, Hagberg H, Kjellmer I** (2003). White matter injury following systemic endotoxemia or asphyxia in the fetal sheep. *Neurochem Res.* Feb;28(2):215-23.
- Martin JA, Kochanek KD, Strobino DM, Guyer B, MacDorman MF** (2005). Annual summary of vital statistics—2003. *Pediatrics.* Mar;115(3):619-34.
- Martinez G, Di Giacomo C, Carnazza ML, Sorrenti V, Castana R, Barcellona ML, Perez-Polo JR, Vanella A** (1997). MAP2, synaptophysin immunostaining in rat brain and behavioral modifications after cerebral postischemic reperfusion. *Dev Neurosci.* 19(6):457-64.
- Marumo G, Kozuma S, Ohyu J, Hamai Y, Machida Y, Kobayashi K, Ryo E, Unno N, Fujii T, Baba K, Okai T, Takashima S, Taketani Y** (2001). Generation of periventricular leukomalacia by repeated umbilical cord occlusion in near-term fetal sheep and its possible pathogenetical mechanisms. *Biol Neonate* 79:39-45.
- Masliah E, Terry RD, Alford M, DeTeresa R** (1990). Quantitative immunohistochemistry of synaptophysin in human neocortex: an alternative method to estimate density of presynaptic terminals in paraffin sections. *J Histochem Cytochem* 38(6): 837-44.
- Matesic DF, Lin RC** (1994). Microtubule-associated protein 2 as an early indicator of ischemia-induced neurodegeneration in the gerbil forebrain. *J Neurochem.* 63(3):1012-20.
- Matsumoto K, Akazawa S, Ishibashi M, Trocino RA, Matsuo H, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Nagamatsu S, Nagataki S** (1995). Abundant expression of

GLUT1 and GLUT3 in rat embryo during the early organogenesis period. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 6;209(1):95-102.

Matus A (1994). Stiff microtubules and neuronal morphology. *Trends Neurosci.* 17(1):19-22. Review.

McCall AL, Moholt-Siebert M, VanBueren A, Cherry NJ, Lessov N, Tiffany N, Thompson M, Downes H, Woodward WR (1995). Progressive hippocampal loss of immunoreactive GLUT3, the neuron-specific glucose transporter, after global forebrain ischemia in the rat. *Brain Res.* 670(1):29-38.

McCall AL, Van Bueren AM, Nipper V, Moholt-Siebert M, Downes H, Lessov N. (1996). Forebrain ischemia increases GLUT1 protein in brain microvessels and parenchyma. *J Cereb Blood Flow Metab.* 16(1): 69-76.

McEwen BS (1994). Corticosteroids and hippocampal plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 746:134-142.

McEwen BS, Albeck D, Cameron H, Chao HM, Gould E, Hastings N, Kuroda Y, Luine V, Magarinos AM, McKittrick CR (1995). Stress and the brain: a paradoxical role for adrenal steroids. *Vitam Horm* 51: 371-402.

Meadow WL, Bell A, Sunstein CR (2003) Statistics, not memories: what was the standard of care for administering antenatal steroids to women in preterm labor between 1985 and 2000? *Obstet Gynecol.* 102(2):356-62.

Molnar J, Nijland MJ, Howe DC, Nathanielsz PW (2002). Evidence for microvascular dysfunction after prenatal dexamethasone at 0.7, 0.75, and 0.8 gestation in sheep. *Am J Physiol* 283:R561-7.

Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Diaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR (1993). Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* Spring;17(1):91-128. Review.

Müller T., Schubert H., Wicher C., Schwab M (2002). Time course of changes in cerebral blood flow during brief complete umbilical cord occlusions in fetal sheep. *J Soc Gynecol Invest* 9 (Suppl.): 176.

Müller T., Frasch M.G., Weiss C., Reinhardt B., Schubert H., Witte O.W., Schwab M (2006). Betamethasone diminishes intracerebral redistribution of

cerebral blood flow during asphyxia and postasphyxic hyperperfusion in fetal sheep. *J Soc Gynecol Invest* 13 (Suppl.): 715

Mulder EJ, Derks JB, Zonneveld MF, Bruinse HW, Visser GH (1994). Transient reduction in fetal activity and heart rate variation after maternal betamethasone administration. *Early Hum Dev* 36(1): 49-60.

Munck A (1971). Glucocorticoid inhibition of glucose uptake by peripheral tissues: old and new evidence, molecular mechanisms, and physiological significance. *Perspect Biol Med* 14(2): 265-9.

Nakai Y, Hirayama A, Mizuguchi M, Takashima S (2002). Changes of GLUT1 expression in normal and periventricular Leukomalacia brains. *Neuroembryology* 1:(141-143).

Navone F, Jahn R, Di Gioia G, Stukenbrok H, Greengard P, De Camilli P (1986). Protein p38: an integral membrane protein specific for small vesicles of neurons and neuroendocrine cells. *J Cell Biol* 103(6 Pt 1): 2511-27.

NIH (2000). Antenatal corticosteroids revisited: repeat courses. *NIH Consens Statement* 17(2):1-18.

Norman MG (1978). Perinatal brain damage. *Perspect Pediatr Pathol* 4:41-92.

Nualart F, Godoy A, Reinicke K (1999). Expression of the hexose transporters GLUT1 and GLUT2 during the early development of the human brain. *Brain Res.* 824(1):97-104.

Ota A, Ikeda T, Ikenoue T, Toshimori K (1997). Sequence of neuronal responses assessed by immunohistochemistry in the newborn rat brain after hypoxia-ischemia. *Am J Obstet Gynecol* 177(3): 519-26.

Ohyu J, Marumo G, Ozawa H, Takashima S, Nakajima K, Kohsaka S, Hamai Y, Machida Y, Kobayashi K, Ryo E, Baba K, Kozuma S, Okai T, Taketani Y (1999). Early axonal and glial pathology in fetal sheep brains with leukomalacia induced by repeated umbilical cord occlusion. *Brain Dev.* 21(4):248-52.

- Ovtscharoff W, Bergmann M, Marqueze-Pouey B, Knaus P, Betz H, Grabs D, Reisert I, Gratzl M.** (1993). Ontogeny of synaptophysin and synaptoporin in the central nervous system: differential expression in striatal neurons and their afferents during development. *Brain Res Dev Brain Res*.72(2):219-25.
- Owen D, Andrews MH, Matthews SG.** (2005). Maternal adversity, glucocorticoids and programming of neuroendocrine function and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev*. 29(2):209-26. review.
- Packan DR, Sapolsky RM.** (1990). Glucocorticoid endangerment of the hippocampus: tissue, steroid and receptor specificity. *Neuroendocrinology*. 51(6):613-8.
- Paneth N, Pinto-Martin J, Gardiner J, Wallenstein S, Katsikiotis V, Hegyi T, Hiatt IM, Susser M.** (1993). Incidence and timing of germinal matrix/intraventricular hemorrhage in low birth weight infants. *Am J Epidemiol*. 137(11):1167-76.
- Pardridge WM, Boado R, Farrel CR** (1990). Brain-type glucose transporter (GLUT1) is selectively localized to the blood-brain barrier. *J Biolog Chem* 285: 18035-40.
- Petersen MC, Nation RL, Asheley JJ, McBride WG** (1980). The placental transfer of betamethasone. *Eur J Clin Pharmacol* 18: 245-247.
- Powers WJ, Rosenbaum JL, Dence CS, Markham J, Videen TO.** (1998). Cerebral glucose transport and metabolism in preterm human infants. *J Cereb Blood Flow Metab* 18(6):632-8.
- Pulsinelli WA, Waldman S, Rawlinson D, Plum F.** (1982). Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage: a neuropathologic study in the rat. *Neurology*. 32(11):1239-46.
- Rakic P, Bourgeois JP, Eckenhoff MF, Zecevic N, Goldman-Rakic PS.** (1986). Concurrent overproduction of synapses in diverse regions of the primate cerebral cortex. *Science*. 232(4747):232-5.

- Reagan LP, McEwen BS.** (1997). Controversies surrounding glucocorticoid-mediated cell death in the hippocampus. *J Chem Neuroanat.* 13(3):149-67. Review.
- Reddy K, Mallard C, Guan J, Marks K, Bennet L, Gunning M, Gunn A, Gluckman P, Williams C** (1998). Maturational change in the cortical response to hypoperfusion injury in the fetal sheep. *Pediatr Res.* 43, 674-82.
- Rees S, Stringer M, Just Y, Hooper SB, Harding R.** (1997). The vulnerability of the fetal sheep brain to hypoxemia at mid-gestation. *Brain Res Dev* 103(2):103-18.
- Rehm H, Wiedenmann B, Betz H** (1986). Molecular characterization of synaptophysin, a major calcium-binding protein of the synaptic vesicle membrane. *EMBO J*, 5: 535-41.
- Reul JM und De Kloet ER**(1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117: 2505-2511.
- Roedel M** (2002). Akute Effekte einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung auf die Hirndurchblutung und die elektrokortikale Hirnfunktion beim fetalen Schaf in utero. Dissertationsschrift. Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Romijn HJ, Hofman MA, Gramsbergen A.** (1991). At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Hum Dev.* Jul;26(1):61-7.
- Rose JC, Kute TE, Winkler L.** (1985). Glucocorticoid receptors in sheep brain tissues during development. *Am J Physiol.* 249(1):E345-9.
- Roy M, Sapolsky RM.** (2003). The exacerbation of hippocampal excitotoxicity by glucocorticoids is not mediated by apoptosis. *Neuroendocrinology.* 77(1):24-31.
- Royer C, Lachuer J, Crouzoulon G, Roux J, Peyronnet J, Mamet J, Pequignot J, Dalmaz Y.** (2000). Effects of gestational hypoxia on mRNA levels of Glut3 and Glut4 transporters, hypoxia inducible factor-1 and thyroid hormone receptors in developing rat brain. *Brain Res.* 21;856(1-2):119-28.

- Ruscher K, Isaev N, Trendelenburg G, Weih M, Iurato L, Meisel A, Dirnagl U** (1998). Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett.* 25;254(2):117-20.
- Sapolsky RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE.** (1990). Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci* 10: 2897-2902.
- Sapolsky RM.** (1994). The physiological relevance of glucocorticoid endangerment of the hippocampus. *Ann N Y Acad Sci* 746: 294-304.
- Sapolsky RM, Pulsinelli WA** (1985). Glucocorticoids potentiate ischemic injury to neurons: therapeutic implications. *Science* 229:1397-1400.
- Sarnat HB, Born DE.** (1999). Synaptophysin immunocytochemistry with thermal intensification: a marker of terminal axonal maturation in the human fetal nervous system. *Brain Dev.* 21(1):41-50.
- Scheinberg P.** (1965). Observations on cerebral carbohydrate metabolism in man. *Ann Intern Med* 62: 367-371.
- Schiffrin BS.** (1995). Antenatal fetal assessment: overview and implications for neurologic injury and routine testing. *Clin Obstet Gynecol.* 38(1):132-41. Review.
- Schleussner E, Arnscheidt C, Müller T, Schneider U, Haueisen J, Schwab K, Schwab M.** (2004). Effects of antenatal glucocorticoids on human fetal cortical function detected by fetal magnetencephalography. *J Soc Gynecol Invest* 11 (Supl.): 69.
- Schnorr B.** (1996). Embryologie der Haustiere. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart
- Schwab M, Roedel M, Anwar MA, Müller T, Schubert H, Buchwalder LF, Walter B, Nathanielsz PW** (2000). Effects of betamethasone administration to the fetal sheep in late gestation on fetal cerebral blood flow. *J Physiol (London)* 528(3): 619-632.

- Schwab M, Antonow-Schlorke I, Kühn B, Müller T, Schubert H, Walter B, Sliwka U, Nathanielsz PW** (2001). Effect of antenatal betamethasone treatment on microtubule associated proteins MAP1B and MAP2 in fetal sheep. *J Physiol (London)* 530(3): 497-506.
- Schwab M, Schmidt K, Roedel M, Müller T, Schubert H, Anwar MA, Nathanielsz PW** (2001). Non-linear changes of electrocortical activity after antenatal betamethasone treatment in fetal sheep. *J Physiol (London)* 531(2): 535-543.
- Schwab M, Coksaygan T, Samtani M, Jusko WJ, Nathanielsz PW** (2004). Kinetics of betamethasone in pregnant sheep after different doses; is the clinical dose supramaximal? *J Soc Gynecol Invest* 11 (Suppl.): 130.
- Schwab M, Wichmann G, Loehle M, Nathanielsz PW, Maurer I, Witte OW** (2005). Antenatal glucocorticoids suppress cytochrome c oxidase activity in the fetal ovine brain. *32th Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society*, Adelaide (Australien), 24.-28.9.2005.
- Scully JL, Otten U** (1995). Glucocorticoids, neutrophins and neurodegeneration. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52: 391-401.
- Senat MV, Minoui S, Multon O, Fernandez H, Frydman R, Ville Y** (1998). Effects of dexamethason and betamethason on fetal heart Rate variability in preterm labour: a randomised study. *Br J Obstet Gynaecol* 105: 749-755.
- Shields JR, Schifrin BS.** (1988). Perinatal antecedents of cerebral palsy. *Obstet Gynecol.* 71(6 Pt 1):899-905. Review.
- Sloboda DM, Challis JR, Moss TJ, Newnham JP.**(2005). Synthetic glucocorticoids: antenatal administration and long-term implications. *Curr Pharm Des.* 11(11):1459-72. Review.
- Supko DE, Johnston MV** (1994). Dexamethasone potentiates NMDA receptor-mediated neuronal injury in the postnatal rat. *Eur J Pharmacol.* 270(1):105-13.
- Szymonowicz W, Walker AM, Yu VY, Stewart ML, Cannata J, Cussen L** (1990). Regional cerebral blood flow after hemorrhagic hypotension in the preterm, near-term, and newborn lamb. *Pediatr Res* 28(4): 361-6.

- Takata K** (1996). Glukose transporters in the transepithelial transport of Glukose. *J Electron Microsc* 45(4): 275-284.
- Takashima S, Armstrong DL, Becker LE** (1978). Subcortical leukomalacia. Relationship to development of the cerebral sulcus and its vascular supply. *Arch Neurol* 35: 470-472
- Tangalakakis K, Lumbers ER, Moritz KM, Towstoles MK, Wintour EM** (1992). Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine fetus. *Exp Physiol* 77(5): 709-17.
- Tanner SL, Franzen R, Jaffe H, Quarles RH** (2000). Evidence for Expression of some Microtubule-associated Protein 1B in neurons as a plasma membrane glycoprotein. *J Neurochem* 75: 553-62.
- Tombaugh GC, Yang SH, Swanson RA, Sapolsky RM** (1992). Glucocorticoids exacerbate hypoxic and hypoglycemic hippocampal injury in vitro: biochemical correlates and a role for astrocytes. *J Neurochem* 59:137-146.
- Towbin A** (1998). Brain damage in the newborn and neurological sequels. Pathologic and clinical correlation.
- Tucker RP** (1990). The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res Reviews* 15: 101-120.
- Tuor UI & Grewal D** (1994). Autoregulation of cerebral blood flow: influence of local brain development and postnatal age. *Am J Physiol* 267(6 Pt 2): H2220-8.
- Tuor UI, Del Bigio MR, Chumas PD** (1996). Brain damage due to cerebral hypoxia/ischemia in the neonate: pathology and pharmacological modification. *Cerebrovasc Brain Metab Rev. Summer*;8(2): 159-93.
- Tuor UI, Yager JY, Bascaramurty S, DelBigio MR** (1997). Dexamethasone prevents hypoxia/ischemia-induced reductions in cerebral glucose utilization and high-energy phosphate metabolites in immature brain. *J Neurochem* 69: 1954-1963.
- Uno H, Lohmiller L, Thieme C, Kemnitz JW, Engle MJ, Roecker EB, Farrell PM** (1990). Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in

fetal rhesus macaques. I. Hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res.* 1;53(2):157-67.

Uno H, Eisele S, Sakai A, Shelton S, Baker E, DeJesus O, Holden J (1994). Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Horm Behav* 28(4): 336-48.

Vannucci SJ (1994). Developmental expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in rat brain. *J Neurochem.* 62(1):240-6.

Vannucci SJ, Clark RR, Koehler-Stec E, Li K, Smith CB, Davies P, Maher F, Simpson IA (1998). Glucose transporter expression in brain: relationship to cerebral glucose utilization. *Dev Neurosci.* 20(4-5):369-79.

Vannucci RC, Mulsce DJ (1992). Effect of glucose on perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Biol Neonate* 62:215-224.

Vannucci SJ, Seaman LB, Vannucci R (1996). Effects of Hypoxia-Ischemia on GLUT1 and GLUT3 Glucosetransporters in Immature Rat Brain. *J Cereb Blood Flow* 16: 77-81.

Vannucci SJ, Simpson IA. (2003). Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285(5):E1127-34.

Vannucci RC, Vannucci SJ (2000). Glucose metabolism in the developing brain. *Semin Perinatol.* 24(2):107-15. Review.

Vannucci RC, Yager JY, Vannucci SJ (1994). Cerebral glucose and energy utilization during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 14(2):279-88.

Viereck C, Tucker RP, Binder LI, Matus A (1988). Phylogenetic conservation of brain microtubule-associated proteins MAP2 and tau. *Neuroscience* 26(3): 893-904.

Virgin CE, Jr., Ha TP, Packan DR, Tombaugh GC, Yang SH, Horner HC, Sapolsky RM (1991). Glucocorticoids inhibit glucose transport and glutamate uptake in hippocampal astrocytes: implications for glucocorticoid neurotoxicity. *J Neurochem* 57:1422-1428.

- Volpe JJ** (1995). *Neurology of the Newborn*. WB Saunders Company, Philadelphia
- Volpe JJ** (1997). Brain injury in the premature infant--from pathogenesis to prevention. *Brain Dev* 19(8): 519-34.
- Volpe, JJ** (2000) *Neurology of the Newborn*. Saunders, Philadelphia.
- Wertheimer E, Sasson S, Cerasi E, Ben-Neriah Y** (1991). The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 belongs to the glucose-regulated protein family of stress-inducible proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(6):2525-9.
- Williams CE, Gunn AJ, Mallard C, Gluckmann PD** (1992). Outcome after ischemia in the developing sheep brain: An electroencephalographic and histological study. *Ann Neurol* 31: 14-21.
- Wiedenmann B, Franke WW** (1985). Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 41: 1017-1028.
- Wiener CM, Booth G, Semenza GL** (1996). In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 14;225(2):485-8.
- Yager JY & Thornhill JA** (1997). The effect of age on susceptibility to hypoxic-ischemic brain damage. *Neurosci Biobehav Rev* 21(2): 167-74.
- Yang K, Jones SA, Challis JR** (1990). Changes in glucocorticoid receptor number in the hypothalamus and pituitary of the sheep fetus with gestational age and after adrenocorticotropin treatment. *Endocrinol* 126: 11-17
- Xia Y, Warshaw JB, Haddad GG** (1995). Chronic hypoxia causes opposite effects on glucose transporter 1 mRNA in mature versus immature rat brain. *Brain Res*. 27;675(1-2):224-30.

8 Anhang

8.1 Danksagung

Ohne vielfältige Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustandegekommen. Ich möchte mich hiermit bei allen Beteiligten herzlich für ihre Hilfe bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Matthias Schwab für die Vergabe der Thematik, die lehrreiche Beratung und Unterstützung, sowie alle Anregungen und kritischen Hinweise bei der Vorbereitung und Fertigstellung der vorliegenden Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich stellvertretend für die Mitarbeiter des Forschungszentrums der FSU Jena bei Frau Iwa Antonow – Schlorke für die stete Ansprechbarkeit bei Problemen und bei Frau Claudia Sommer, welche mir beim Erlernen der Techniken behilflich war, bedanken.

Die experimentelle Arbeit wurde am Institut für Versuchstierkunde der Friedrich – Schiller Universität Jena durchgeführt. Für die Unterstützung sowie das freundliche Arbeitsklima möchte ich mich bei allen Mitarbeitern, besonders bei Herrn Dr. rer. nat. Harald Schubert sowie Herrn Dr. med. vet. Thomas Müller, bedanken.

Meiner Familie danke ich für ihre immerwährende Geduld und Nachsicht.

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Anett Herrmann
geb. am 24.02.1979 in Jena
ledig, 1 Sohn

Schulbildung

1985 - 1987 Grundschule, Jena
1987 - 1990 Oberschule, Jena
1990 - 1997 Reichwein Gymnasium, Jena

Studium

1997 - 2004 Studium der Humanmedizin, FSU Jena
1999 Physikum
2000 1. Staatsexamen
2002 2. Staatsexamen
2004 3. Staatsexamen

Famulaturen

University Hospital, Kuopio/Finnland (Anästhesie)
Hospital Enniskillen/Nordirland (Notaufnahme)
Universitätskrankenhaus Perm/Russland (Kinderchirurgie)

2003 Praktisches Jahr

University Medical Centre, Tucson Arizona (Gyn /Geburtshilfe)

Weiterbildung

2004 Assistenzärztin der Gynäkologie/Geburtshilfe im HELIOS
KKH Gotha

8.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr PD Dr. med. Matthias Schwab (Klinik für Neurologie),

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers